

Antibiotika aus Basidiomyceten, XV [1]. 1-Hydroxy-2-nonyl-4-on, ein antifungischer und cytotoxischer Metabolit aus *Ischnoderma benzoinum* (Wahl.) Karst.

Antibiotics from Basidiomycetes. XV [1]. 1-Hydroxy-2-nonyl-4-one, an Antifungal and Cytotoxic Metabolite from *Ischnoderma benzoinum* (Wahl.) Karst.

Timm Anke

Abteilung Biotechnologie der Universität, Paul-Ehrlich-Str., Geb. 22, D-6750 Kaiserslautern

Bruno-Max Giannetti und Wolfgang Steglich

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität, Gerhard-Domagk-Str. 1, D-5300 Bonn

Z. Naturforsch. 37 c, 1–4 (1982); received October 31, 1981

Acetylenic Metabolite, Antifungal, Cytotoxic

A new antibiotic, 1-hydroxy-2-nonyl-4-one (**1**), has been isolated from submerged cultures of several strains of *Ischnoderma benzoinum*. The compound exhibits high inhibitory activity against yeasts and filamentous fungi at concentrations of 1–5 µg/ml. DNA, RNA, and protein syntheses in cells of the ascitic form of Ehrlich carcinoma are strongly inhibited by the same concentrations.

Einleitung

Ischnoderma benzoinum ist ein auffälliger schwarzbrauner Porling, der an abgestorbenen Nadelhölzern große konsolenförmige Fruchtkörper ausbildet. Die taxonomische Stellung der Gattung und Art wird bei Donk [2] diskutiert. In unserem Screening von Basidiomyceten-Kulturen waren uns verschiedene Stämme von *Ischnoderma benzoinum* durch die Bildung eines stark antifungischen und cytotoxischen Metaboliten aufgefallen. Dieser Metabolit erwies sich als nicht identisch oder verwandt mit Ungulinsäure und Polyporensäure C, zwei Antibiotika, die bereits früher von Birkinshaw *et al.* [3] aus Oberflächenkulturen von *Ischnoderma benzoinum* isoliert worden waren. Die antibakteriellen Eigenschaften beider Verbindungen wurden von Marcus [4] beschrieben. In der folgenden Arbeit möchten wir über Produktion, Isolierung, Strukturaufklärung und biologische Aktivität des neuen Antibiotikums berichten.

Fermentation und Isolierung

Kulturen der untersuchten Stämme von *Ischnoderma benzoinum* wurden aus Gewebestückchen von

Fruchtkörpern angelegt. Unter den gewählten Bedingungen produzierten alle Stämme in Submerskultur das gleiche Antibiotikum. Die besten Ausbeuten, 3–6 mg/l, lieferte der Stamm 79202, der von einem Fruchtkörper auf *Pinus* isoliert worden war. Zwei Stämme von Fruchtkörpern auf *Picea* lieferten geringere Ausbeuten. Fermentationen im 10 und 20 l Maßstab wurden wie im experimentellen Teil beschrieben durchgeführt. Nach 9–10 Tagen wurde das Antibiotikum mit Essigester aus dem Kulturfiltrat extrahiert und der eingeeengte Rohextrakt an Kieselgel chromatographiert. Die durchschnittlichen Ausbeuten lagen bei 30–50 mg/10 l Kultur. Das reine Antibiotikum ist ein gelbliches Öl, das sich beim Stehen an der Luft rasch unter Braunfärbung zersetzt. In verdünnter ethanolischer Lösung kann es bei –20 °C längere Zeit aufbewahrt werden. Das Antibiotikum ist löslich in Methanol, Ethanol und Chloroform und zeigt im Laufmittel Benzol/Aceton/Essigsäure 70:30:1 einen *R_F*-Wert von 0.75 (Merck 5554 Kieselgelplatten).

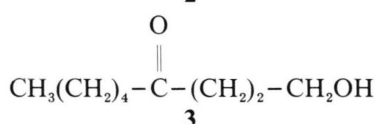
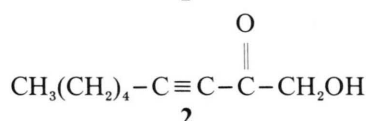
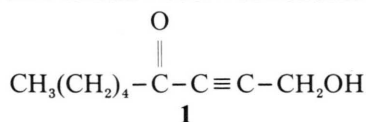
Konstitutionsermittlung

Das Antibiotikum zeigt im UV-Spektrum (MeOH) ein Maximum bei $\lambda = 218$ nm mit einer Schulter bei 223 nm. Nach den IR-Banden bei 3500, 2200 und 1675 cm⁻¹ (in CHCl₃) liegen OH-, C \equiv C- und α,β -ungesättigte CO-Funktionen vor. Das Massenspek-

Reprint requests to Prof. Dr. T. Anke and Prof. Dr. W. Steglich.

0341-0382/82/0100-0001 \$ 01.00/0

trum liefert kein Molekülion, jedoch läßt sich aus der Elementaranalyse die Summenformel $C_9H_{14}O_2$ ableiten. Sie wird durch das ^{13}C -NMR-Spektrum ($CDCl_3$) bestätigt, das Signale für 3 quarternäre C, 1 CH_3 - und 5 CH_2 -Gruppen aufweist. Im 1H -NMR-Spektrum erkennt man neben einem CH_2OH -Dublett bei $\delta = 4.44$ (+ $D_2O \rightarrow$ Singulett) die typischen Signale einer *n*-Pentylgruppe. Berücksichtigt man diese Ergebnisse, so kommen für die Verbindung nur die Formeln **1** oder **2** in Betracht.



Eine Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten erlaubt die katalytische Hydrierung mit Pd/C , bei der das Tetrahydroderivat **3** entsteht. Da bei **3** das 1H -NMR-Signal der CH_2OH -Gruppe als Triplet erscheint, kann das Antibiotikum nur 1-Hydroxy-2-nonin-4-on (**1**) sein.

Biologische Eigenschaften des Antibiotikums aus *Ischnoderma benzoinum*

Aus Basidiomyceten und Höheren Pflanzen wurde eine große Zahl von Acetylenverbindungen beschrieben [5–7]. Viele dieser Naturstoffe sind toxisch für Pro- und Eukaryonten [8, 9].

Das antimikrobielle Wirkungsspektrum von 1-Hydroxy-2-nonin-4-on im Verdünnungsreihen- und Plattendiffusionstest ist in Tab. I wiedergegeben. Die Verbindung wirkt stark antifungisch gegen Hefen und eine Reihe von phytopathogenen mycelbildenden Pilzen. Die antifungische Wirkung ist wesentlich stärker als die von Nonin-(1) oder (2)-Noninsäure methylester [10]. Die antibakterielle Wirkung des Antibiotikums ist sehr gering, die minimalen Hemmkonzentrationen der wenigen empfindlichen Teststämmen liegen bei oder über 50 $\mu g/ml$. Das Antibiotikum aus *Ischnoderma benzoinum* zeigt eine starke cytotoxische Wirkung auf Zellen des Ehrlich Ascites Carzinoms der Maus (Fig. 1). Be-

Tab. I. Wirkungsspektrum des Antibiotikums aus *Ischnoderma benzoinum*.

Testorganismus	MHK [$\mu\text{g/ml}$]	
Reihenverdünnungstest		
<i>Aerobacter aerogenes</i>		100
<i>Arthrobacter citreus</i>		50
<i>Bacillus brevis</i>		100
<i>Bacillus subtilis</i>		> 100
<i>Corynebacterium insidiosum</i>		100
<i>Escherichia coli</i> K12		> 100
<i>Micrococcus roseus</i>	50 – 100	
<i>Micrococcus luteus</i>		100
<i>Mycobacterium phlei</i>		> 100
<i>Proteus vulgaris</i>	50 – 100	
<i>Staphylococcus aureus</i>		> 100
<i>Streptomyces spec.</i> ATCC 23836		100
<i>Candida albicans</i>		20
<i>Nadsonia fulvescens</i>	1 – 5	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1 – 5	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> α S 288c	1 – 5	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> is 1	1 – 5	
Plattendiffusionstest		
	Durchmesser des Hemmhofes [mm] $\mu\text{g/Rondelle}$	
	1	10
<i>Ascochyta pisi</i>	— ^a	8
<i>Aspergillus panamensis</i>	20	30
<i>Botrytis cinerea</i>	—	13
<i>Fusarium cubense</i>	9	13
<i>Mucor hiemalis</i>	—	9
<i>Paecilomyces variotii</i>	10	20
<i>Pleospora herbarum</i>	—	12

^a kein Hemmhof

reits bei Konzentrationen von 5 $\mu g/ml$ wird der Einbau von Thymidin in DNS vollständig gehemmt. Der Einbau von Leucin in Protein und Uridin in RNS wird weniger stark beeinflusst. **1** besitzt eine reaktionsfähige Dreifachbindung, die mit Thiolen wie Cystein leicht unter Bildung von Addukten reagiert. Wie aus Tab. II hervorgeht, wirken die Reaktionsprodukte mit Cystein nicht mehr cytotoxisch. Die Inaktivierung eines Enzyms mit essentiellen Thiolgruppen wurde am Beispiel der Alkohol-Dehydrogenase untersucht. In einem Testansatz nach [11] wurde eine 80-prozentige Hemmung der Enzymaktivität nach 5-minütiger Vorinkubation mit 60 $\mu g/ml$ des Antibiotikums gefunden. Die Verbindung zeigt bis zu Konzentrationen von 100 $\mu g/ml$ keine haemolytische Aktivität im Test mit Rinder-Erythrocyten. Eine mutagene Wirkung im Spot-Test nach Ames *et al.* [12] mit Histidin-auxotrophen *Salmonella typhimurium*-Mutanten konnte nicht nachgewiesen werden.

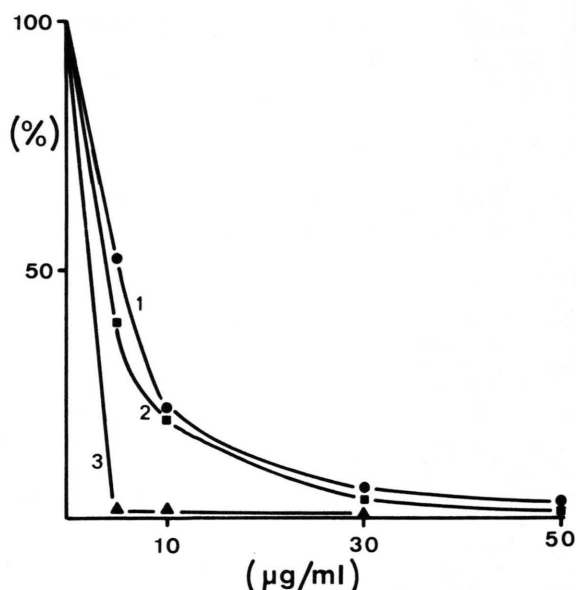


Fig. 1. Wirkung des Antibiotikums aus *Ischnoderma benzoinum* auf die Makromolekülsynthesen in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms in % der Kontrollen ohne Antibiotikum. 1) Proteinsynthese; 2) RNS Synthese; 3) DNS Synthese. Kontrollen ohne Antibiotikum, Einbau pro ml Zellsuspension: [^{14}C]Leucin 7363 cpm, [^{14}C]Uridin 3347 cpm, [^{14}C]Thymidin 1058 cpm.

Experimenteller Teil

UV-Spektrum: Beckman Modell 25.-IR-Spektren: Pye Unicam SP 100 (Intensitätsangaben in Klammern: m = Mittel, st = stark, br = breit). — ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren: Bruker WH 90 (TMS als innerer Standard, δ -Werte). Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel Mallinckrodt der Fa. Serva verwendet; DC: Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ der Fa. Merck. Fließmittelsystem: Benzol/Aceton/Essigsäure (70:30:1, Vol.).

Biologische Tests: Die Aufnahme des Wirkungsspektrums und der Einbau radioaktiv markierter

Tab. II. Wirkung des Antibiotikums aus *Ischnoderma benzoinum* auf die Makromolekülsynthesen von Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms nach Reaktion mit L-Cystein.

Antibiotikum [µg/ml]	Einbau in % der Kontrollen ohne Antibiotikum		
	Leucin	Uridin	Thymidin
10	46	59	3
10 + 9 L-Cystein ^a	109	88	84

^a Vor der Zugabe der Zellsuspension wurde das Antibiotikum 15 min mit Cystein in EtOH-H₂O 1:5 bei 22 °C inkubiert.

Vorstufen in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms erfolgte wie früher beschrieben [13].

Der Mutagenitätstest mit den Stämmen *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 und TA 1538 wurde als Spot-Test ohne Zugabe von Rattenlebermikrosomen nach der Vorschrift von Ames et al. [12] durchgeführt. Die Prüfung auf hämolytische Eigenschaften mit Rinder-Erythrocyten erfolgte nach der Haemoglobincyanid-Methode [14].

Fermentation und Isolierung

Kulturen der Stämme *Ischnoderma benzoinum* 78155, 78165, 78192, 79202 und 80280 wurden aus steril entnommenen Gewebestückchen von Fruchtkörpern angelegt. Für die Submerkskultur und Aufbewahrung auf Schrägagarröhrchen wurde ein Hefeextrakt-Malzextrakt-Glucose (HMG) Medium folgender Zusammensetzung verwendet: Hefeextrakt (Difco) 4 g/l; Malzextrakt (Löflund) 1 g/l; Glucose 4 g/l. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 5.5 eingestellt.

Für feste Nährböden wurde 2% Agar zugegeben. Die Fermentation erfolgte in 10 oder 20 l HMG Medium in New Brunswick FS 314 (2 l Luft/min, 150 upm, 22 °C) oder Biolafitte C-6 Fermentern (2 l Luft/min, 200 upm, 22 °C). Beimpft wurde mit 1,5–2% einer 14 Tage gewachsenen Vorkultur.

Nach 9–10 Tagen Fermentation wurde das Mycel abfiltriert und verworfen. Je 10 l Kulturfiltrat wurden mit 3 l Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt (400–500 mg) auf eine Säule mit Kieselgel (2,5 × 8 cm; Kieselgel „Mallinckrodt“, Serva, Heidelberg) aufgetragen. Elution mit CH₂Cl₂ ergab 30–50 mg reines Antibiotikum als gelbliches Öl.

1-Hydroxy-2-nonin-4-on (I)

IR (CHCl₃): 3500 (m, br), 2920 (m), 2900 (m), 2200 (m), 1675 (st), 1460 (m), 1440 (m), 1390 (m), 1340 (m), 1225 (m), 1150 (m), 1100 (m), 1080 (m), 1040–1025 cm⁻¹ (m, br). — ^1H -NMR (CDCl₃): δ = 0.86 (t, J = 6 Hz) [3H]; 1.26, 1.64 (m) [6]; 1.53 [OH]; 2.53 (t, J = 7 Hz) [2]; 4.44 (d, J = 4 Hz) [2] (+ D₂O → s). — ^{13}C -NMR (CDCl₃): δ = 13.8 (q, C-9); 22.3 (t, C-8); 23.5 (t, C-6); 31.1 (t, C-7); 45.3 (t, C-5); 50.7 (t, C-1); 84.5, 89.7 (jeweils s, C-2 bzw. C-3); 188.1 (s, C-4).

C₉H₁₄O₂ (154.2) Ber. C 70.12 H 9.09
Gef. C 69.01 H 8.69

l-Hydroxy-nonan-4-on (3)

10 mg **1** werden in 70 ml absolutem Methanol mit einer Spatelspitze Pd/C-Katalysator (10%) 1–2 h unter Durchleiten von H₂ hydriert. Nach üblicher Aufarbeitung farbloses Öl, *R_F* = 0.86 – UV (MeOH): Endabsorption. – IR (CHCl₃): 3500 (m, br), 2920 (m), 2900 (m), 1710 cm⁻¹ (st). – ¹H-NMR: δ = 0,89

(t, *J* = 6 Hz) [3]; 1.31, 1.86 (m) [8]; 2.17 [OH]; 2.64 (m) [4]; 3.64 (t, *J* = 6.5 Hz) [2].

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

- [1] Antibiotika aus Basidiomyceten XIV; J. Kupka, T. Anke, B.-M. Giannetti, and W. Steglich, Arch. Mikrobiol. **130**, 223 (1981).
- [2] M. A. Donk, Check List of European Polypores, p. 99, North-Holland Publishing Co., Amsterdam-London 1974.
- [3] J. H. Birkinshaw, E. N. Morgan u. W. P. K. Findlay, Biochem. J. **50**, 516 (1952).
- [4] S. Marcus, Biochem. J. **50**, 516 (1952).
- [5] F. Bohlmann, T. Burkhardt u. C. Zdero, Naturally Occuring Acetylenes, Academic Press, London-New York 1973.
- [6] M. Anchel, Antibiotics. Vol. **2**, 189, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967.
- [7] V. Thaller, Aliphatic and Relat. Nat. Prod. Chem. **1**, 1 (1979).
- [8] J. Reisch, W. Spitzner u. K. E. Schulte, Z. Arzneimittel Forsch. **17**, 816 (1967).
- [9] G. H. N. Towers u. C.-K. Wat, Rev. Latinoamer. Chim. **9**, 162 (1978).
- [10] H. Gershorn u. L. Shanks, Can. J. Microbiol. **24**, 593 (1978).
- [11] Biochemika Information II, Boehringer Mannheim 1975.
- [12] B. N. Ames, J. McCann u. E. Yamasaki, Mut. Res. **31**, 347, (1975).
- [13] J. Kupka, T. Anke, F. Oberwinkler, G. Schramm u. W. Steglich, J. Antibiotics **32**, 130 (1979).
- [14] E. Merck, Darmstadt, Klinisches Labor, 12. Auflage 1974.