

**Über die Synthese und die biologische
Abbaubarkeit von Stilbencarbonsäuren
sowie die analytische Erfassung von
Substrat und Abbauprodukten**

A B H A N D L U N G

zur Erlangung des Titels eines Doktors
der technischen Wissenschaften der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

ROLAND STAEBLIN

dipl. Chem. ETH

geboren am 15. Juli 1952

von Lachen/SZ und Zürich

Angenommen auf Antrag von

Prof.Dr.H.Zollinger, Referent

Prof.Dr.R.Hütter, Korreferent

1980

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit bezweckte, Informationen über die mikrobiologische Abbaubarkeit von Stilbenverbindungen zu gewinnen. Sie umfasste erstens

- die Erarbeitung von allgemeinen Methoden zur Synthese von Stilbencarbonsäuren und der erwarteten primären Abbauprodukte, zweitens
- die Bereitstellung eines geeigneten analytischen Systems zur quantitativen und qualitativen Erfassung der genannten Verbindungen und ihrer Abbauprodukte und drittens
- ein Screening nach Mikroorganismen, die die Modellverbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden können.

- A) Eine allgemein synthetische Zugänglichkeit der Stilbencarbonsäuren konnte nach Optimierung dreier Reaktionstypen erreicht werden :
- a) Die Mc Murry-Kopplung zweier Benzaldehydmoleküle eignete sich vorzüglich zur Synthese symmetrisch substituierter Stilbene. Die Ausbeuten lagen zwischen 50 und 80% .
 - b) Die Synthese der asymmetrisch substituierten Stilbene erfolgte nach der Wittig-Methode (Ausbeuten : meistens ca. 60%).
 - c) Der Ersatz der carboxylierten Edukte durch die entsprechenden bromierten Verbindungen war eine wichtige Voraussetzung für das Gelingen der Kopplungen nach Mc Murry bzw. Wittig. Die verschiedenen substituierten Stilbencarbonsäuren wurden über einen Austausch des Broms durch Lithium bei -70°C und anschliessendes Umsetzen der organischen Lithiumverbindung mit CO_2 erreicht (unterschiedliche Ausbeuten).

B) Die Arbeiten mit analytischer Zielsetzung konzentrierten sich hauptsächlich auf die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) und die Gaschromatographie (GC). Für routinemässige Konzentrationsmessungen genügte die HPLC allein. Unter Verwendung von reversed-phase-Material als stationäre und Methanol/Wasser-Gemischen mit geringen Zusätzen von Tetraalkylammoniumsalzen ($[\text{CH}_3[\text{CH}_2]_n]_4\text{N}^{\oplus}\text{X}^{\ominus}$; $0 < n \leq 6$) als mobile Phase konnten alle Trennprobleme gelöst werden.

Zur Erniedrigung der Nachweisgrenzen und zur Vereinfachung der Trennprobleme bei der Metabolitenforschung wurden Methoden zur Veresterung kleinster Carbonsäuremengen ausgearbeitet. Die Derivatisierung unter Phasentransferkatalyse mit aromatischen Reagentien, die im UV-Bereich stark absorbieren oder fluoreszieren, senkte die Erfassungsgrenze bis in den ppb-Bereich.

Zur gaschromatographischen Bestimmung kleinster Mengen an organischen Säuren in biologischen Medien diente eine Derivatisierung mit Ethyljodid. Diese analytische Methode bot den Vorteil tiefer Nachweisgrenzen, der Möglichkeit zur Kopplung mit einer Strukturaufklärungsmethode (Massenspektrometer) und von hohen Trennleistungen dank Verwendung von Kapillarsäulen. Nachteilig wirkten sich gewisse Einschränkungen in der Anwendbarkeit aus: Verbindungen mit zu hoher Polarität (z.B. hydroxylierte Benzoesäure-derivate) waren im GC nicht analysierbar.

C) Als Modellverbindungen für die mikrobiellen Abbauersuche dienten o,o'-Dicarboxystilben, p,p'-Dicarboxystilben, o-Carboxystilben und p-Carboxystilben.

Ausgedehnte Abbauersuche nach dem Batch-Prinzip blieben bei allen 4 Modellverbindungen erfolglos. Ansätze in kontinuierlicher Kultur unter Zudosierung von Hefeextrakt als kohlenstofflimitierendes Substrat ergaben im Falle des p,p'-Dicarboxystilbens eine stilbenabbauende Aktivität. In Batch-Versuchen konnte diese Abbauleistung in fort-

laufender Ueberimpfung ohne Zusatz von Hefeextrakt gesteigert werden. Es ist zu vermuten, dass die Kultur die Modellverbindung als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwertete. Dies bekräftigte das Resultat eines Abbaues von ^{14}C -markiertem p,p'-Dicarboxystilben im Fermenter : 73,4% der eingesetzten Radioaktivitätsmenge wurde als ^{14}C -markiertes CO_2 zurückgewonnen.