

WILHELM FRIEDRICH und KONRAD BERNHAUER

Zur Chemie und Biochemie der „Cobalamine“, IX¹⁾**Die Isolierung der Benzimidazol- und
5-Methyl-benzimidazol-cobalamin-Analoga aus Faulschlamm**Aus dem Biochemischen Forschungslaboratorium
der Aschaffener Zellstoffwerke AG., Stockstadt a. M.

(Eingegangen am 20. Juni 1958)

Aus Abwasserfaulschlamm von Hefefabriken werden die Benzimidazol- und 5-Methyl-benzimidazol-cobalamin-Analoga in kristallisierter Form gewonnen. Ihre Struktur wird durch Abbau zu den entsprechenden Nucleotiden und Basen sowie durch Vergleich mit den biosynthetisch hergestellten „Cobalaminen“ sichergestellt.

Bei der halbtechnischen Cellulosechromatographie von Konzentraten, die aus ca. 1100 cbm Faulschlamm zweier Hefefabriken (D und N) stammten, wurde jeweils eine zwischen Vitamin B₁₂ und Faktor III liegende Fraktion²⁾ erhalten, aus der nach wiederholter Cellulosechromatographie mit verschiedenen Entwicklern und elektro-phoretischer Reinigung zwei kristallisierte Cobalamin-Analoga (I und II) gewonnen wurden. Die Verarbeitung der Konzentrate aus D und N sowie die Strukturermittlung der daraus gewonnenen Analoga I und II erfolgten getrennt, um so nähere Aussagen über die Herkunft der betreffenden Produkte machen zu können.

I erwies sich als *5-Methyl-benzimidazol-cobalamin-Analogen*¹⁾. Beweise hierfür sind: Es besitzt in verschiedenen Entwicklersystemen³⁾ die gleiche papierchromatographische Beweglichkeit sowie das gleiche UV-Absorptionsspektrum (s. Abbild. 1) wie das biosynthetisch hergestellte „Cobalamin“^{1,4-7)}; das UV-Absorptionsspektrum des Nucleotides aus I ist identisch mit dem aus biosynthetischem 5-Methyl-benzimidazol-cobalamin-Analogen¹⁾ (s. Tabelle) und verschieden von dem aus dem ebenfalls biosynthetisch hergestellten 6-Methyl-benzimidazol-cobalamin-Analogen¹⁾; aus I wurde 5-Methyl-benzimidazol isoliert.

II wurde als *Benzimidazol-cobalamin-Analogen* identifiziert. Papierchromatographisch stimmte es zwar trotz Anwendung zahlreicher Entwickler sowohl mit dem Benzimidazol-cobalamin-Analogen biosynthetischer Herkunft^{4,5,7-9)} als auch mit dem

1) VIII. Mittell.: W. FRIEDRICH und K. BERNHAUER, Chem. Ber. **91**, 1665 [1958].

2) Wir danken Herrn Dr. Hw. DELLWEG für die Überlassung dieser Fraktion.

3) W. FRIEDRICH, G. GROSS und K. BERNHAUER, Mikrochim. Acta **1956**, 134.

4) K. BERNHAUER und W. FRIEDRICH, Angew. Chem. **66**, 776 [1954].

5) J. E. FORD, E. S. HOLDSWORTH und S. K. KON, Biochem. J. **58**, Proc. XXIV [1954]; **59**, 86 [1955].

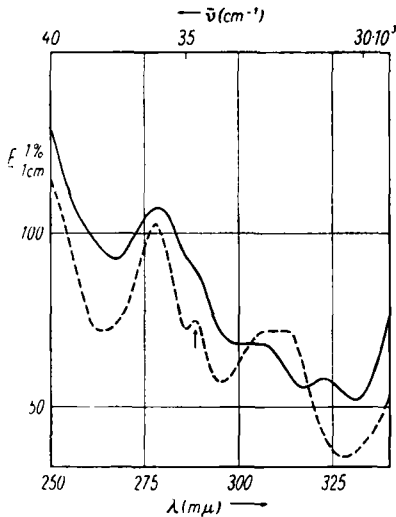
6) J. PAWELKIEWICZ, Acta Biochim. Polon. **1**, 313 [1954].

7) Hw. DELLWEG, E. BECHER und K. BERNHAUER, Biochem. Z. **327**, 422 [1956].

8) J. PAWELKIEWICZ und K. NOWAKOWSKA, Acta Biochim. Polon. **2**, 259 [1955].

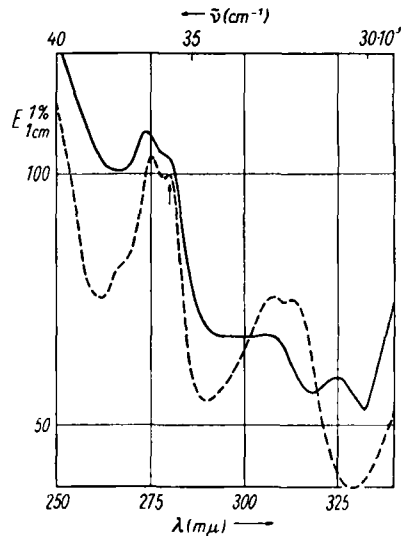
9) K. H. FANTES und C. H. O'CALLAGHAN, Biochem. J. **58**, Proc. XXI [1954]; **59**, 79 [1955].

5-Methoxy-benzimidazol-cobalamin-Analogon (Faktor III_m¹⁰) völlig überein, es war jedoch gemäß seinem UV-Absorptionsspektrum (s. Abbild. 2) eindeutig vom letzteren verschieden und dem biosynthetischen Benzimidazol-cobalamin-Analogon¹¹⁾



Abbild. 1. UV-Absorptionsspektrum des 5-Methyl-benzimidazol-cobalamin-Analogons (I) in Wasser.

— Monocyankomplex, p_H 6 (Maximum bei 278 $m\mu$), ----- Dicyankomplex, p_H 10.5 (Maxima bei 278 $m\mu$, 288 $m\mu$ und 306–313 $m\mu$). Die bei 288 $m\mu$ auftretende Schulter bzw. schwache Bande (†) gehört zum Nucleotidanteil



Abbild. 2. UV-Absorptionsspektrum des Benzimidazol-cobalamin-Analogons (II) in Wasser.

— Monocyankomplex, p_H 6 (Maximum bei 274 $m\mu$), ----- Dicyankomplex, p_H 10.5 (Maxima bei 275 $m\mu$, 280 $m\mu$ und 306–313 $m\mu$). Die bei 280 $m\mu$ auftretende Schulter bzw. schwache Bande (†) gehört zum Nucleotidanteil

UV-Absorptions-Maxima und -Minima der aus I und II isolierten Nucleotide und Basen sowie verwandter Substanzen (in Wasser; λ in $m\mu$)

Substanz	p_H 1.0			p_H 12.0			Abs.-Min.	
	Abs.-Max.	Abs.-Min.		Abs.-Max.	Abs.-Min.			
Nucleotid aus I	282	275	232	288	280	247.5	266.5	299
Nucleotid aus biosynthet. 5-Methyl-benzimidazol-cobalamin-Analogon ¹⁾	282	275	231.5	288	280	247.5	266.5	228.5
Base aus I	280	273.5	229	282	276	245	260	229
5-Methyl-benzimidazol ¹²⁾	279.9	273.2	229	282	276	244.5	260.5	226
Nucleotid aus II	274.8	268	226	279.8	272.5	245	262	224
1-Methyl-benzimidazol ¹²⁾	274.4	267.8	223	279.8	272.9	253	261.5	224
Base aus II	273	266.5	223	277.5	271	242.5	257	223
Benzimidazol ¹²⁾	273	266.5	222	277.2	270.8	242.2	257	222.5

¹⁰⁾ W. FRIEDRICH und K. BERNHAUER, Chem. Ber. 89, 2030 [1956].

¹¹⁾ Wir danken Dr. S. K. KON für die freundliche Überlassung des Präparates.

¹²⁾ G. H. BEAVEN, E. R. HOLIDAY und E. A. JOHNSON, Spectrochim. Acta [London] 4, 338 [1951].

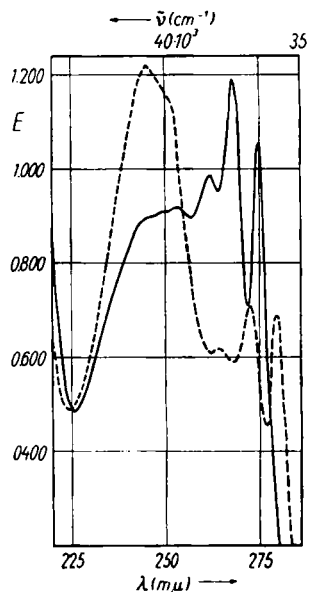
ähnlich. Das aus II gewonnene Nucleotid (s. Abbild. 3 und Tabelle) zeigte in seiner UV-Absorption eine große Ähnlichkeit mit 1-Methyl-benzimidazol¹²⁾; die daraus gewonnene kristallisierte Base erwies sich schließlich sowohl in ihrem UV-Absorptionsspektrum (s. Tabelle) als auch auf Grund des direkten Vergleiches mit einer authentischen Probe als identisch mit Benzimidazol.

Weder das 5-Methyl-benzimidazol-cobalamin-Analogon noch das Benzimidazol-cobalamin-Analogon, noch die in ihnen enthaltenen Basen, 5-Methyl-benzimidazol und Benzimidazol, wurden bisher in der Natur aufgefunden.

Die UV-Absorptionsspektren von I und II (s. Abbild. 1 und 2) unterscheiden sich deutlich voneinander und sind durch eine charakteristische, schwach ausgeprägte Schulter (in der Monocyanoform) bzw. Bande (in der Dicyanoform) bei 288 bzw. 280 m μ gekennzeichnet. Diese Banden entstammen dem Nucleotidanteil in seiner Basenform (s. Abbild. 3 und Tabelle). In den Monocyanokomplexen der „Cobalamine“ ist der Nucleotidanteil durch die N-3-Co-Bindung „deformiert“, weshalb hier die entsprechende Bande des Nucleotides nur schwach angedeutet ist. In den Dicyanokomplexen, in denen N-3 nicht an Kobalt gebunden ist, leistet dagegen der Nucleotidanteil den erwarteten additiven Beitrag zum Gesamtspektrum des Moleküls.

Die Möglichkeit, daß Benzimidazol bzw. 5-Methyl-benzimidazol in die betreffenden Kläranlagen (D und N) mit Abwässern der chemischen Industrie gelangt sein könnten, ist dadurch ausgeschlossen, daß diese Kläranlagen ausschließlich mit Abwässern von Hefefabriken gespeist werden (bzw. zur Zeit der Entnahme gespeist wurden). In diesen Hefefabriken wird weder mit Benzimidazol noch mit 5-Methyl-benzimidazol gearbeitet. Für den biologischen Ursprung der beiden Cobalamin-Analoga bzw. der in ihnen enthaltenen Basen spricht außerdem die Tatsache, daß diese „Cobalamine“ im Faulschlamm beider Kläranlagen in annähernd gleicher Menge vorkommen (zusammen etwa 30 bzw. 60 mg in je 100 cbm Faulschlamm). Die Frage, ob die zur mikrobiellen Synthese dieser Cobalamin-Arten erforderlichen Basen, Benzimidazol und 5-Methyl-benzimidazol, mikrobiellen oder pflanzlichen Ursprungs sind, läßt sich noch nicht beantworten. In beiden Hefefabriken wird Zuckerrübenmelasse verarbeitet.

Die Auffindung der beiden Benzimidazol-cobalamin-Analoga als Naturprodukte ist u. a. im Hinblick auf die Biosynthese des Vitamins B₁₂ bzw. des in ihm enthaltenen 5,6-Dimethyl-benzimidazols bemerkenswert. Die Möglichkeit, daß dieses durch stufenweise biosynthetische Methylierung des Benzimidazols entstehen könnte, er-



Abbild. 3. UV-Absorptionsspektrum des Nucleotides aus dem Benzimidazol-cobalamin-Analogon (II) in 0.03 n HCl ——— und in 0.03 n KOH - - - - -

scheint damit diskutabel, noch dazu wenn man die besondere Reaktionsbereitschaft der 5- und 6-Position des Benzimidazols berücksichtigt.

Wie sich zeigte, ist es unmöglich, die Benzimidazol- und 5-Methoxy-benzimidazol-cobalamin-Analoga papierchromatographisch zu trennen. Daraus geht hervor, daß hier die Methylgruppe und der Äthersauerstoff auf den Verlauf des Verteilungsprozesses genau entgegengesetzt wirken. Es ist dies der erste Fall, daß zwei komplette (nucleotidhaltige) „Cobalamine“ papierchromatographisch nicht trennbar sind.

Die Isolierung des Benzimidazol-cobalamin-Analogons war auch deshalb überraschend, weil mit dem Vorkommen von 5-Methoxy-benzimidazol-cobalamin-Analogon (Faktor III_m) im Faulschlamm gerechnet werden konnte, da dessen Entstehung durch biologische Methylierung des 5-Hydroxy-benzimidazol-cobalamin-Analogons (Faktor III) naheliegend wäre. Da nun aber das Benzimidazol-cobalamin-Analogon isoliert wurde, das weder durch Extraktionsprozesse noch durch Chromatographie vom Faktor III_m trennbar ist, erscheint bewiesen, daß Faktor III_m in den untersuchten Faulschlämmen nicht vorkommt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Gewinnung der Benzimidazol- und 5-Methyl-benzimidazol-cobalamin-Analoga aus Faulschlamm: Die bei der halbtechnischen Cellulosechromatographie von Konzentraten aus ca. 1100 cbm Hefabwasser-Faulschlamm zweier verschiedener Kläranlagen (D und N)¹³⁾ anfallenden, zwischen den Zonen von Vitamin B₁₂ und Faktor III befindlichen Fraktionen wurden in folgenden Schritten weiterverarbeitet:

1. Chromatographie des Ausgangsmaterials (als „Kieselgurprodukt“) in einer größeren Anzahl von Cellulosesäulen¹⁴⁾ (7 × 20 cm; Entwickler n-Butanol + 15% Wasser, enthaltend 0.5 ccm 10-proz. HCN-Lösung im Liter). Dabei wurde eine Mittelfraktion gewonnen unter Abtrennung einer größeren Menge Faktor Ib¹⁵⁾ und langsamer als Faktor III laufender Cobalamin-Analoga sowie nicht-B₁₂-artiger Verunreinigungen.

2. Chromatographie des aus der Mittelfraktion gewonnenen Konzentrates (als „Kieselgurprodukt“) in mehreren Cellulosesäulen (7 × 30 cm; Entwickler in ccm: n-Butanol 415, Wasser 40, 25-proz. NH₃-Lösung 45, 10-proz. HCN-Lösung 0.5). Dabei wurden mehrere Zonen erhalten. Die schnellste Zone enthielt das Cobalamin-Analogon I mit etwas Vitamin B₁₂, die langsamere wandernde das Cobalamin-Analogon II. Diese beiden Zonen waren nicht vollständig voneinander getrennt, recht gut jedoch von der nachfolgenden, sehr kräftigen Zone des 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogons¹⁶⁾. Die schlechte Trennung der Zonen mit den Stoffen I und II voneinander war durch begleitende proteinartige Verunreinigungen verursacht.

¹³⁾ Ca. 750 cbm aus der von der Hefefabrik Pleser, Darmstadt, gespeisten Kläranlage Darmstadt-Eberstadt (D) und ca. 350 cbm aus der von der Hefe- und Spiritfabrik Schneider, Nuttlar, gespeisten Kläranlage Nuttlar des Ruhrverbandes (N).

¹⁴⁾ Bei den chromatographischen Operationen im Labormaßstab wurde stets Linterspulver Nr. 124 der Fa. Schleicher & Schüll verwendet. Die Durchlaufgeschwindigkeit des Entwicklers betrug im Durchschnitt 1 cm/Stde., d. h. 1 cm Niveaudifferenz des Entwicklers in der Säule je Stde. Es wurde meist ununterbrochen 2–4 Wochen entwickelt.

¹⁵⁾ Hw. DELLWEG und K. BERNHAUER, Arch. Biochem. Biophysics **69**, 74 [1957].

¹⁶⁾ W. FRIEDRICH und K. BERNHAUER, Angew. Chem. **69**, 478 [1957]; Chem. Ber. **90**, 1966 [1957].

3. Durch Elektrophorese des wäßrigen Konzentrates der vereinigten, I und II enthaltenden Zonen auf Kartons (Schleicher & Schüll, Nr. 2230) in Phosphatpuffer vom p_H 7.2 wurden anodisch wandernde proteinartige Verunreinigungen beseitigt.

4. Chromatographie des aus der elektrophoretisch gereinigten Fraktion gewonnenen Konzentrates (als „Kieselgurprodukt“) in mehreren Cellulosesäulen (3.6×32 cm; Entwickler in ccm: n-Butanol 425, Wasser 75, Eisessig 5, 10-proz. HCN-Lösung 0.5). Dabei wurde Vitamin B_{12} als rascheste Zone größtenteils beseitigt, sowie I ($R_{B_{12}} = 0.7$) und II ($R_{B_{12}} = 0.5$) voneinander getrennt.

5. Durch nochmalige getrennte Elektrophorese der die Stoffe I und II enthaltenden Fraktionen bei p_H 7.2 und sodann bei p_H 2.6 wurden die restlichen proteinartigen Verunreinigungen beseitigt.

6. Durch getrennte Chromatographie der die Stoffe I bzw. II enthaltenden Fraktionen in Cellulosesäulen (3.4×39 cm; Entwickler n-Butanol/Wasser, gesättigt mit $KClO_4$, CN-Ionen wie üblich) wurden restliche Mengen von Vitamin B_{12} und des 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogons entfernt. I mußte zwecks Beseitigung der noch anhaftenden Spuren an 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogen unter Benutzung des NH_3 -haltigen Entwicklers (s. unter 2.) nochmals chromatographiert werden.

Nach der üblichen Weiterverarbeitung der nun völlig reinen Fraktionen kristallisierte I in feinen, II in etwas größeren Spießen aus wäßrigem Aceton. Beide Cobalamin-Analoga besaßen im Wachstumstest gegenüber *E. coli* 113—3 und *L. leichmannii* die bereits bekannte Aktivität⁵⁾.

Ausb. an I 102 mg aus Kläranlage D, 60 mg aus Kläranlage N

Ausb. an II 333 mg aus Kläranlage D, 44 mg aus Kläranlage N

Abbau des 5-Methyl-benzimidazol-cobalamin-Analogons: Eine Lösung von 80 mg I (enthaltend ca. 10% Wasser) in 4 ccm 70-proz. Perchlorsäure wurde 4 Stdn. bei 20° stehengelassen. Aus dem Hydrolysat wurde, wie bereits beschrieben¹⁾, Faktor B und das Nucleotid, aus dem letzteren 5-Methyl-benzimidazol gewonnen. Ausbeute gemäß der spektrophotometrischen Bestimmung ca. 5 mg (ca. 70% d. Th.). Die Base aus I sowie synthet. 5-Methyl-benzimidazol hatten übereinstimmend die R_F -Werte (1) 0.84, (2) 0.92 und (3) 0.92 bei Verwendung von (1) n-Butanol/Eisessig/Wasser (5:4:1), (2) n-Butanol/Wasser/25-proz. NH_3 -Lösung (86:14:1) und (3) wassergesätt. n-Butanol als Entwickler sowie gleiche elektrophoretische Beweglichkeit in verd. Essigsäure.

Abbau des Benzimidazol-cobalamin-Analogons: Eine Lösung von 200 mg II (enthaltend ca. 10% Wasser) in 7 ccm 70-proz. Perchlorsäure wurde 4 Stdn. stehengelassen. Aus dem Hydrolysat erhielt man in üblicher Weise (s. oben) Faktor B und das amorphe Nucleotid. Durch Hydrolyse des letzteren mit 6 n HCl bei 150° während 4 Stdn. und Chromatographie des Hydrolysates durch Dowex 50 sowie Amberlite IR-4B wurde Benzimidazol gewonnen. Aus Wasser farblose Blättchen. Schmp. sowie Misch-Schmp. mit authent. Substanz 170—172°. Ausb. 12 mg (ca. 66% d. Th.).