

240. Naturstoffe aus Mikroorganismen

8. Mitteilung [1]

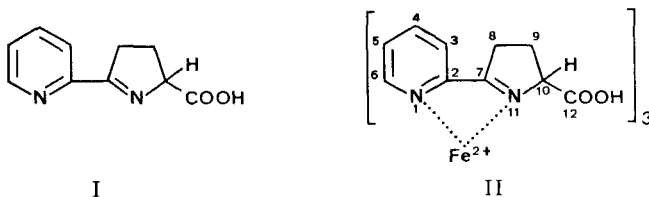
Optimale Gewinnung von Proferrorosamin A aus *Pseudomonas roseus fluorescens* J. C. MARCHAL 1937¹⁾von André Marcel Helbling²⁾ und Max Viscontini

Organisch-chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(28. VI. 76)

Optimum Obtention of Proferrorosamine A from *Pseudomonas roseus fluorescens* J. C. MARCHAL 1937. – *Summary.* We have developed the best conditions for the culture of *Pseudomonas roseus fluorescens*, and a quantitative isolation of the Proferrorosamine A produced in the culture solution, in order to study the incorporation of 1-[¹⁴C]-glycerol in this propigment.

In der 4. Mitteilung [2] haben wir bewiesen, dass während des Wachstums von *Pseudomonas roseus fluorescens* (Abkürzung: *Ps.ros.fl.*) in synthetischer Nährlösung (nach Lasseur) eine Beziehung zwischen der Bildung von Tryptophan und dem Proferrorosamin A (I) besteht. Insbesondere haben wir gezeigt, dass das zu der Nährlösung zugesetzte Tryptophan die Biogenese des Proferrorosamins A hemmt. Um die Beziehungen Tryptophan–Proferrorosamin A besser verstehen zu können, haben wir zunächst die Biogenese des Propigmentes I und dann jene der α -Aminosäure untersucht.



Die ersten Experimente mit ¹⁴C-markierten Metaboliten haben zu folgenden Ergebnissen geführt: (a) Picolinsäure wird sehr rasch und in guter Rate (50%) in Proferrorosamin A eingebaut [3]; (b) Piperidin-2-carbonsäure hingegen wird kaum verwendet und kommt als Vorläufer des Propigmentes nicht in Frage [4]; (c) L-Lysin wird mit einer Rate von 10%, und zwar ausschliesslich im Pyridin-Kern eingebaut [4]; (d) L-Glutaminsäure wird ebenfalls im Pyridin-Kern eingebaut, jedoch mit einer Rate von nur 1,3% [3].

¹⁾ Teil der Dissertation von A. M. Helbling, Universität Zürich, 1975.

²⁾ Gegenwärtige Adresse: The University of Texas at Austin, Dept. of Chemistry, Austin, Tx 78712, USA.

Aufgrund dieser Ergebnisse nahmen wir an, dass Glycerin der Vorläufer von L-Lysin und demnach von Picolinsäure und L-Asparagin jener des Pyrrolin-Kerns sein könnte. Um diese Hypothese zu belegen, haben wir nun *Ps. ros. fl.* mit 1-[^{14}C]-Glycerin wachsen lassen und die Verteilung von ^{14}C im gebildeten Proferrorosamin bestimmt³⁾. Dafür mussten wir Wachstumsbedingungen für die Bakterien-Kulturen entwickeln, welche es erlauben, in möglichst kurzer Zeit hohe Populationsdichten und grosse Mengen an Proferrorosamin A zu erzielen.

Für die bis anhin durchgeführten Arbeiten mit *Ps. ros. fl.* ist das Propigment I stets in Roux-Flaschen unter den von Marchal beschriebenen Bedingungen [5] gewonnen worden. Diese Methode erwies sich für unsere Biogenese-Untersuchungen als ungünstig, da wir damit nur schlecht reproduzierbare Ergebnisse erhielten. Marchal wies später darauf hin, dass die Bildung des Propigmentes in Fe^{2+} -freier Lösung durch Bewegung der Kultur-Flaschen begünstigt wird [6]. Wir haben diese Technik übernommen und den Einfluss verschiedener Wachstumsparameter wie Nährlösung, Temperatur, pH, O_2 und Gefäss untersucht, um optimale Wachstumsbedingungen zu erhalten.

1. *Nährlösung und Temperatur.* Die beste Nährlösung ist die von Lasseur entwickelte synthetische Lösung ohne Fe^{2+} [5] [7]. Dieses Spurenelement wird nur für die Aufbewahrung der Kulturen auf Schrägagar verwendet. Impf- und Nährlösung bleiben stets völlig eisenfrei. Für das Wachstum des *Ps. ros. fl.* haben wir das von Marchal [5] angegebene Temperatur-Optimum von 25° übernommen.

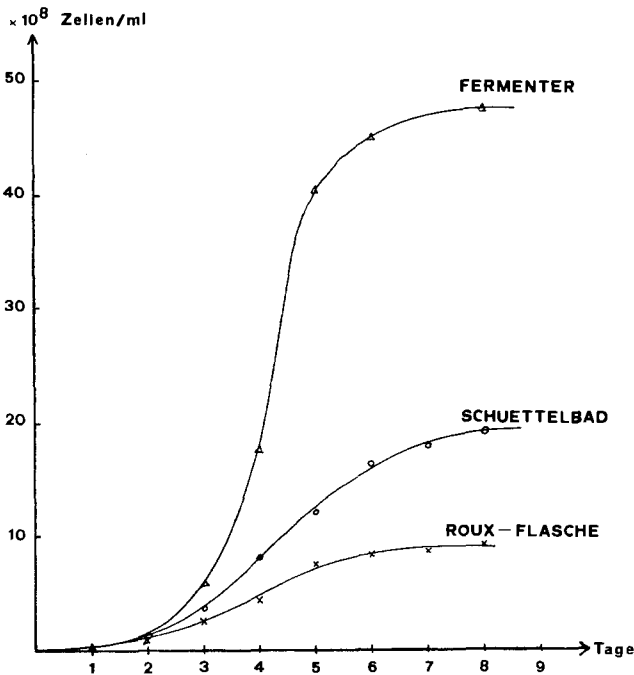


Fig. 1. Wachstumskurven von *Pseudomonas roseus fluorescens*

³⁾ Siehe die folgende Mitteilung.

2. *Gefäss. Ps.ros.fl.* kann Proferrorosamin A (I) nur unter aeroben Bedingungen produzieren. Deshalb benützten wir das Submersverfahren, wo der erforderliche Sauerstoffaustausch an der Oberfläche durch Turbulenz erzeugt wird. In dem von uns verwendeten 2-l-Fermenter (Typ KS 2000, *Skan AG*, Basel) wird die Luft durch ein Sterilfilter entkeimt und am Boden des Kulturgefässes eingeleitet. Der Vergleich der Wachstumskurven (Lebendkeimzahlen) in *Roux*-Flaschen, im Schüttelbad und im Fermenter zeigt deutlich die Überlegenheit des letzteren (Fig. 1).

3. *Sauerstoff-Konzentration.* Die verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen im Fermenter wurden mittels einer automatischen pO_2 -Elektrode eingestellt. Versuche mit reinem Sauerstoff, einer künstlichen Mischung von Sauerstoff/Stickstoff 2:8 und Pressluft ergaben für letztere die besten Ausbeuten an Propigment (Fig. 2). Warum

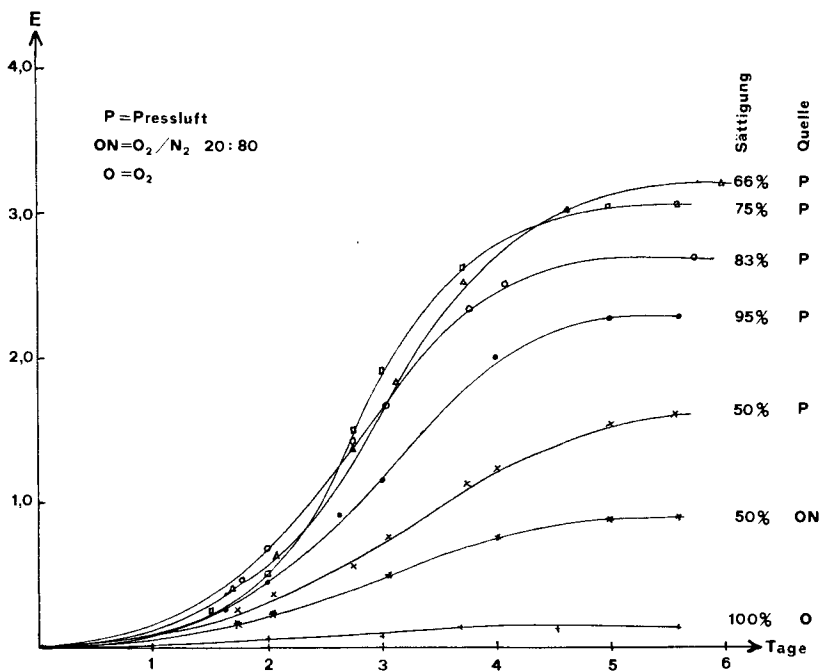


Fig. 2. Einfluss der Sauerstoff-Konzentration auf die Proferrorosamin-Bildung (E: Extinktion des Proferrorosamins als Ferrorosamin in sichtbarem Bereich gemessen)

Pressluft besser als die künstliche Mischung wirkt, wurde nicht untersucht. Die Abhängigkeit der Propigment-Bildung von der Konzentration an Sauerstoff in der Nährlösung geht ebenfalls aus Fig. 2 hervor. Die optimale O₂-Konzentration liegt zwischen 60 und 70% der O₂-Sättigung. Unsere Versuche wurden bei einer Sauerstoff-Konzentration durchgeführt, die 66% O₂-Sättigung mit Pressluft als Quelle entspricht.

4. *Optimaler pH.* Schon in den ersten Arbeiten mit *Ps.ros.fl.* wurde der Einfluss der H₃O⁺-Konzentration auf das Wachstum des Bakteriums festgestellt [5]. Eine systematische Untersuchung dieses Einflusses in eisenfreier, bewegter Nährlösung

lieferte die in den Fig. 3 und 4 wiedergegebenen Ergebnisse. Darnach ändert sich der pH während des Wachstums ständig und der für die Bildung des Proferrerosamins A optimale, anfängliche pH-Wert liegt bei 6,8–7,0. Wir haben für unsere Versuche einen Anfangs-pH von 6,8 gewählt.

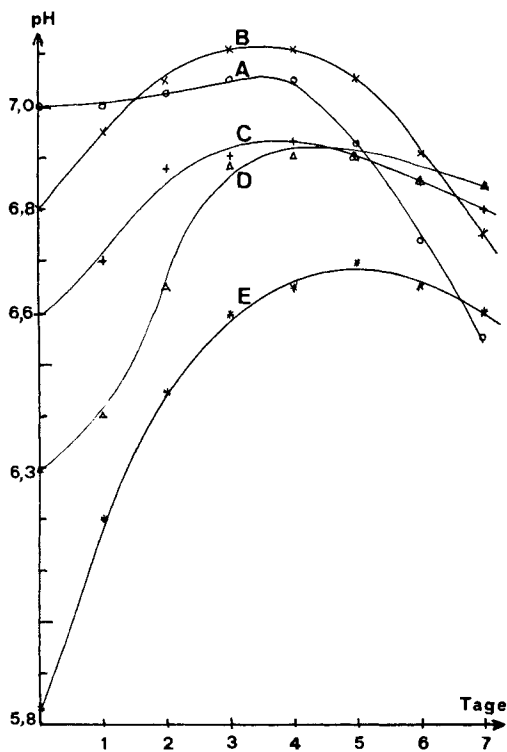


Fig. 3. pH-Veränderung der Nährlösung bei verschiedenen, anfänglichen pH-Werten

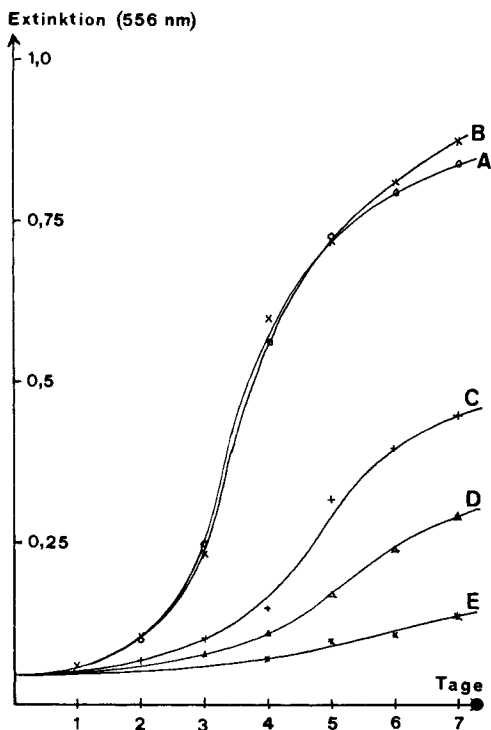
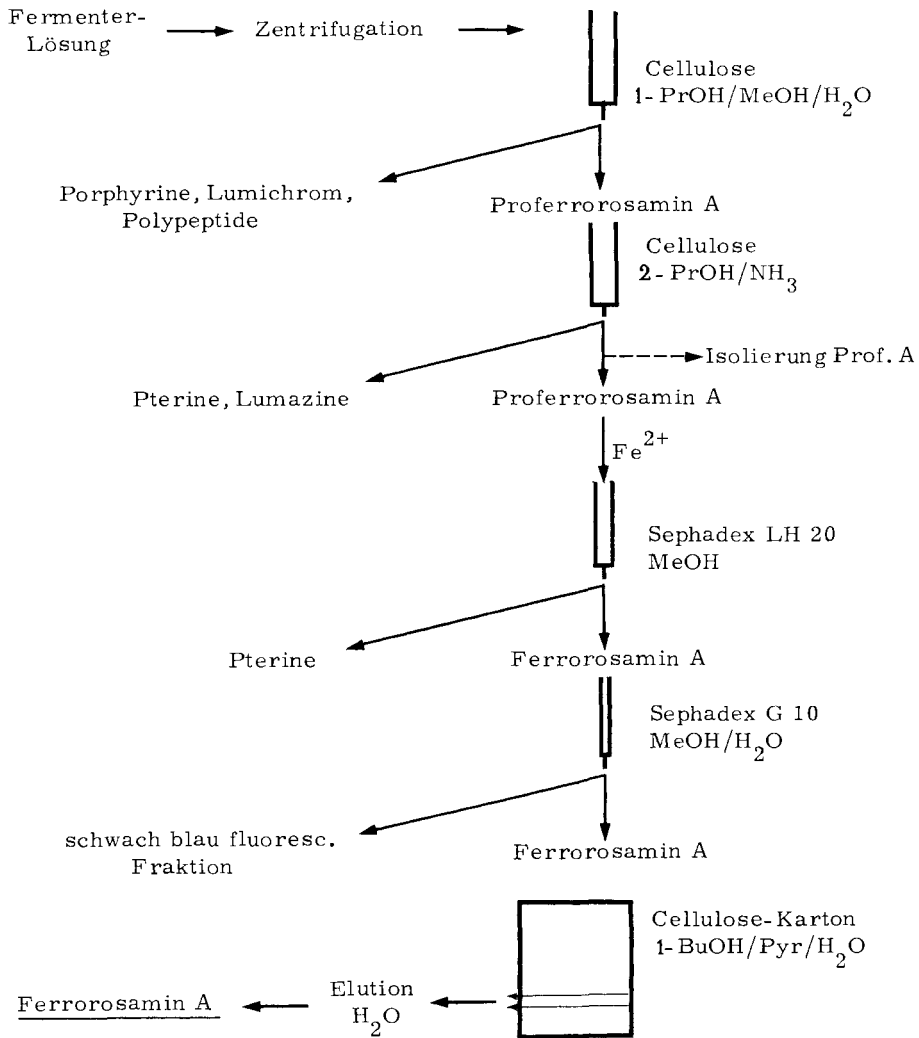


Fig. 4. Proferrerosamin-Bildung bei den in Fig. 3 wiedergegebenen pH-Bedingungen A-E

Nachdem die besten Bedingungen für eine schnelle und gut reproduzierbare Bildung von Proferrerosamin A (I) ermittelt waren, haben wir ein Trennverfahren entwickelt, mit welchem das Ferrerosamin A (II) in bester Ausbeute isoliert wird (Schema 1). Die Isolierung des Propigmentes selbst ist schwierig, da es unbeständig ist. Stark eingeeengte Lösungen von Proferrerosamin A werden braun, ölen aus und verlieren die typische Fähigkeit, mit Fe^{2+} einen Komplex zu bilden. Deshalb wurde nie mit konzentrierten Lösungen gearbeitet. Zur Abtrennung der Porphyrine, der Pterine und des Lumichroms wurde zweimal an Cellulose chromatographiert. Dann wurde das Proferrerosamin A mit Fe^{2+} in Ferrerosamin A umgewandelt und letzteres mittels Gel-Chromatographie gereinigt. Die Isolierung von Ferrerosamin A ist im exper. Teil ausführlich beschrieben. Die Isolierung und Reinigung von Proferrerosamin A selbst kann mittels Säulenchromatographie auf Sephadex und anschließender Hochspannungselektrophorese durchgeführt werden, erweist sich aber als sehr mühsam.

Schema 1



Wir danken Herrn Dr. W. Frei und Frau R. Reimann für ihre grosse Hilfe bei der Bakterienzucht, Herrn B. Thüler und Fr. J. Ulrich für Glasarbeiten, sowie Herrn Stolz (mechanische Werkstatt) für viele Arbeiten und Handreichungen. Das *Pseudomonas roseus fluorescens* wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. J. C. Marchal, Universität Nancy, Frankreich, zur Verfügung gestellt, wofür wir ihm besonders danken.

Experimenteller Teil

Kulturen von Ps. ros. fl. Für die Aufbewahrung der Kulturen im Kühlschrank benutzen wir folgendes Glycerin/Agar-Milieu: 25,0 g Glycerin, 9,0 g L-Asparagin, 2,5 g K₂HPO₄, 2,5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0,1 g FeSO₄, 0,4 g CaCl₂ · 6H₂O und 15,0 g Agar. Das Gemisch wird in 1 l kochendem Wasser gelöst, aufgekocht und mit Kalilauge und Salzsäure auf pH 6,8 gebracht. Nach dem Abfüllen in Reagenzgläser (7 ml) wird die Agar-Lösung 25 Min. bei 125° sterilisiert. Nach dem Animpfen der Schrägagar-Reagenzgläser lässt man die Kulturen 4 Tage im Brutschrank bei 25°

stehen, wobei allmählich die charakteristische karminrote Farbe des Ferrorosamins A sichtbar wird. Diese im Kühlschrank gelagerten Kulturen dienen zum Animpfen der Fermenter-Impflösung. Die Schräg-Kulturen werden alle 4–6 Wochen erneuert.

Impf- und Fermenter-Nährlösung. Für einen Fermenter-Ansatz von 1,25 l werden folgende Fe²⁺-freien Substanzen verwendet: 30,0 g Glycerin (87%), 10,8 g L-Asparagin, 3,0 g K₂HPO₄, 3,0 g MgSO₄ · 7 H₂O und 0,48 g CaCl₂ · 6 H₂O. Nach dem Auffüllen der Lösung auf 1,2 l mit 2 × destilliertem Wasser wird der pH mit 0,1 N HCl auf genau 6,80 eingestellt und die Nährlösung auf 1,25 l ergänzt. Aus dieser Lösung werden 50 ml entnommen und sterilisiert (25 Min., 125°). Sie werden mit 5–6 Platinösen aus einer Agar-Kultur angeimpft. Nach 4 Tagen im Brutschrank (25°) ist diese Impflösung bereit für das Animpfen der Fermenter-Lösung.

Wachstum von Ps. ros. fl. Die verbleibende Nährlösung (1,20 l) wird im Fermenter 1 Std. (25°, 750 U./Min.) gerührt und belüftet. Als Antischaummittel fügt man 4 Tropfen Silicon-Entschäumer Art 7743 (*Merck*) zu der Lösung, die 20 Min. auf 120° sterilisiert wird.

Nach dem Animpfen der Nährlösung wird die Luftzufuhr auf 66% Sättigung reguliert. Für die ganze Dauer des Wachstums bleiben die gleichen Bestimmungen bestehen (25°, 750 U./Min., 66% Sättigung). Nach 4–5 Tagen ist die optimale Menge von Proferrorosamin A erreicht und das Wachstum wird unterbrochen.

Isolierung von Ferrorosamin A (II). Die Bakterien werden von der überstehenden Nährlösung bei 10° abzentrifugiert (2 Std., 3000 U./Min.). Danach wird die grüngelbe, stark fluoreszierende Lösung nach Zugabe von einigen ml 1-Propanol auf 150 ml eingengt (40°/12 Torr), mit 50 ml 1-Propanol und 25 ml Methanol versetzt, auf 100 ml eingengt, zentrifugiert, die Lösung auf eine Säule [Cellulose CF 11 (*Whatman*) 98 × 12 cm] gebracht und mit 1-Propanol/Methanol/Wasser 2:1:1 eluiert. Porphyrine, Polypeptide und Lumichrom bleiben adsorbiert an der Cellulose zurück. Für die zweite Cellulose-Chromatographie (6 × 20 cm) benützt man 2-Propanol/1% NH₃ 2:1, als Eluierungsmittel. Dabei bleiben Pterine und Lumazine adsorbiert an der Cellulose zurück. Das schwach fluoreszierende Propigment I ist im Eluat mit DC. (Kieselgel HF₂₅₄, *Merck*) nachweisbar [Rf 0,55 (2-Propanol/1proz. NH₃-Lösung 2:1); Rf 0,58 (Äthanol/konz. Salzsäure 30:0,1)].

Das rohe Proferrorosamin (I) wird mit Fe²⁺ zum violettroten Ferrorosamin (II) umgesetzt, welches an einer Säule [Sephadex LH 20 (4 × 45 cm), Methanol], daraufhin an einer anderen Säule [Sephadex G 10 (4 × 35 cm), Methanol/Wasser 1:1] gereinigt wird (Eliminierung von UV.-absorbierenden Begleitsubstanzen). Die abschließende Papierchromatographie erfolgt auf einem Cellulose-Karton Nr. 2727 (*Schleicher-Schüll*, Feldbach) mit Butanol/Pyridin/Wasser 13:20:20. Ohne den Karton trocknen zu lassen, wird die rote Zone mit Wasser eluiert, filtriert, eingedampft (40°/12 Torr) und i.V. getrocknet (10 Std., 50°): ca. 100 mg reines Pigment II. DC.: Rf 0,10 (2-Propanol/1proz. NH₃-Lösung 2:1); Rf 0,33 (Äthanol/konz. Salzsäure 30:0,1).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 7. Mitt.: A. M. Helbling & M. Viscontini, *Helv.* 59, 938 (1976).
- [2] M. Pouteau-Thouvenot, M. Choussy, M. Barbier & M. Viscontini, *Helv.* 52, 2392 (1969).
- [3] M. Pouteau-Thouvenot, J. Padikkala, M. Barbier, A. M. Helbling & M. Viscontini, *Helv.* 55, 2295 (1972).
- [4] M. Pouteau-Thouvenot, J. Padikkala, M. Barbier & M. Viscontini, *Helv.* 56, 1067 (1973).
- [5] J. C. Marchal, *Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy* 10, 90 (1937).
- [6] J. C. Marchal & L. Poirson, *Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy* 20, 83 (1970).
- [7] M. Pouteau-Thouvenot, M. Choussy, A. Gaudemer & M. Barbier, *Bull. Soc. chim. biol.* 52, 51 (1970).