

## 240. Naturstoffe aus Mikroorganismen

8. Mitteilung [1]

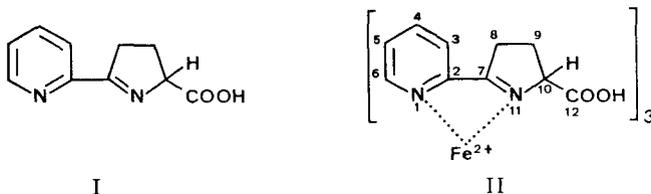
Optimale Gewinnung von Proferrorosamin A aus *Pseudomonas roseus fluorescens* J. C. MARCHAL 1937<sup>1)</sup>von André Marcel Helbling<sup>2)</sup> und Max Viscontini

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-[<sup>14</sup>C]-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  $\alpha$ -Aminosäure untersucht.



Die ersten Experimente mit <sup>14</sup>C-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].

<sup>1)</sup> Teil der Dissertation von A. M. Helbling, Universität Zürich, 1975.

<sup>2)</sup> 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- $^{14}\text{C}$ -Glycerin wachsen lassen und die Verteilung von  $^{14}\text{C}$  im gebildeten Proferrorosamin bestimmt<sup>3)</sup>. 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  $\text{Fe}^{2+}$ -freier Lösung durch Bewegung der Kultur-Flaschen begünstigt wird [6]. Wir haben diese Technik übernommen und den Einfluss verschiedener Wachstumsparameter wie Nährlösung, Temperatur, pH,  $\text{O}_2$  und Gefäss untersucht, um optimale Wachstumsbedingungen zu erhalten.

1. *Nährlösung und Temperatur.* Die beste Nährlösung ist die von Lasseur entwickelte synthetische Lösung ohne  $\text{Fe}^{2+}$  [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  $25^\circ$  übernommen.

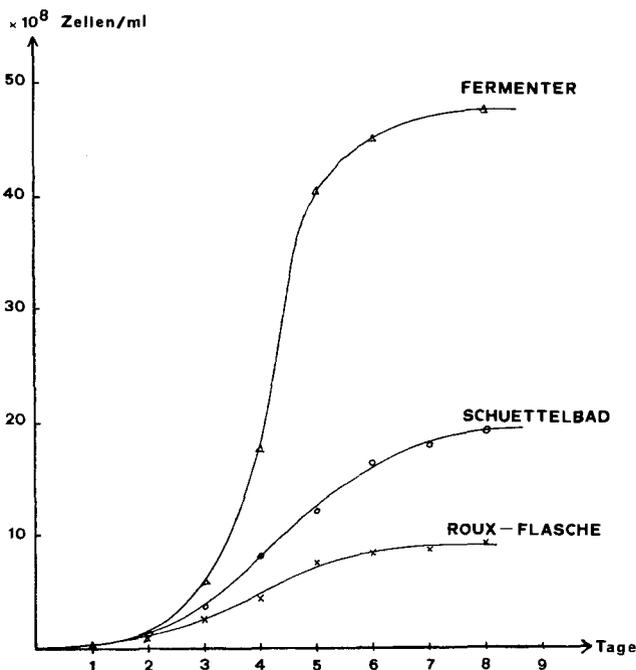


Fig. 1. Wachstumskurven von *Pseudomonas roseus fluorescens*

<sup>3)</sup> 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

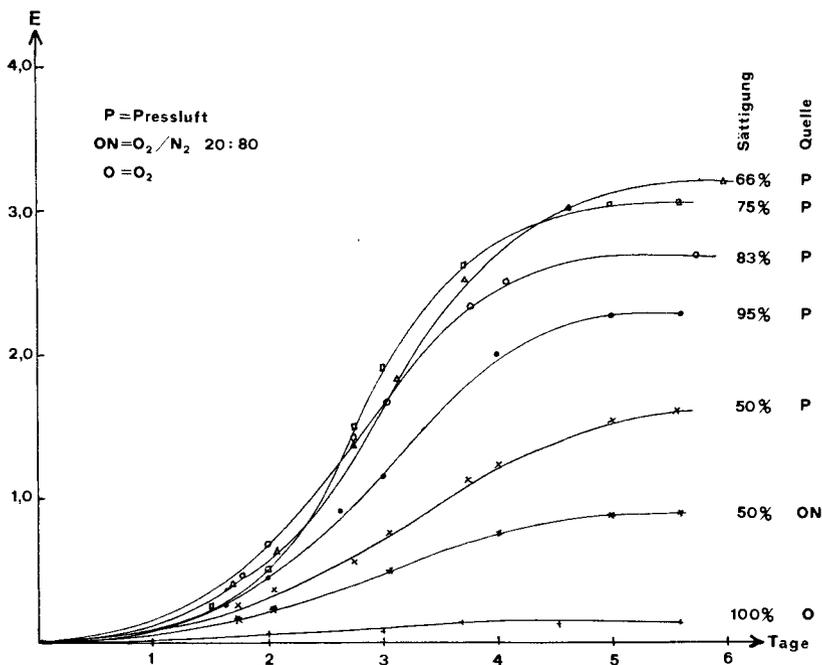


Fig. 2. Einfluss der Sauerstoff-Konzentration auf die Proferrorosamin-Bildung (E: Extinktion des Proferrorosamins als Ferrorosamin in sichtbarem Bereich gemessen)

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 O<sub>2</sub>-Konzentration liegt zwischen 60 und 70% der O<sub>2</sub>-Sättigung. Unsere Versuche wurden bei einer Sauerstoff-Konzentration durchgeführt, die 66% O<sub>2</sub>-Sättigung mit Pressluft als Quelle entspricht.

4. *Optimaler pH.* Schon in den ersten Arbeiten mit *Ps. ros. fl.* wurde der Einfluss der H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-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.

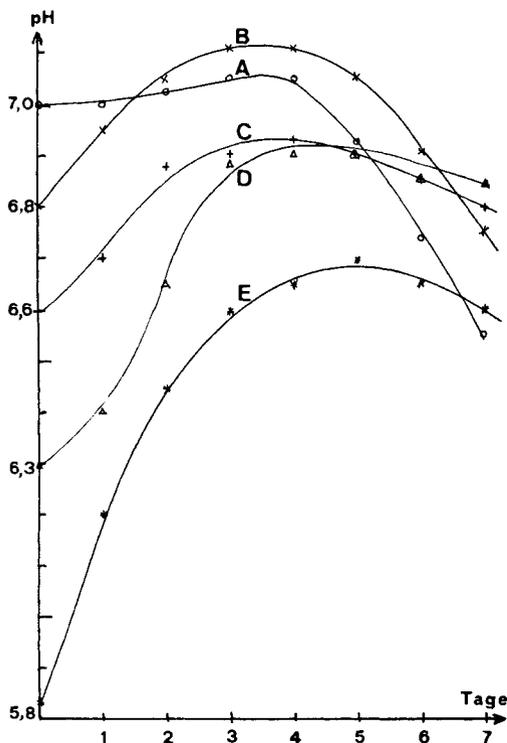


Fig. 3. pH-Veränderung der Nährlösung bei verschiedenen, anfänglichen pH-Werten

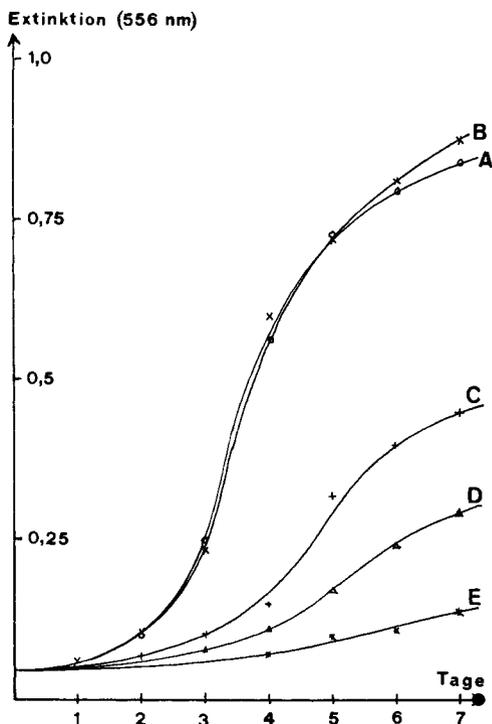
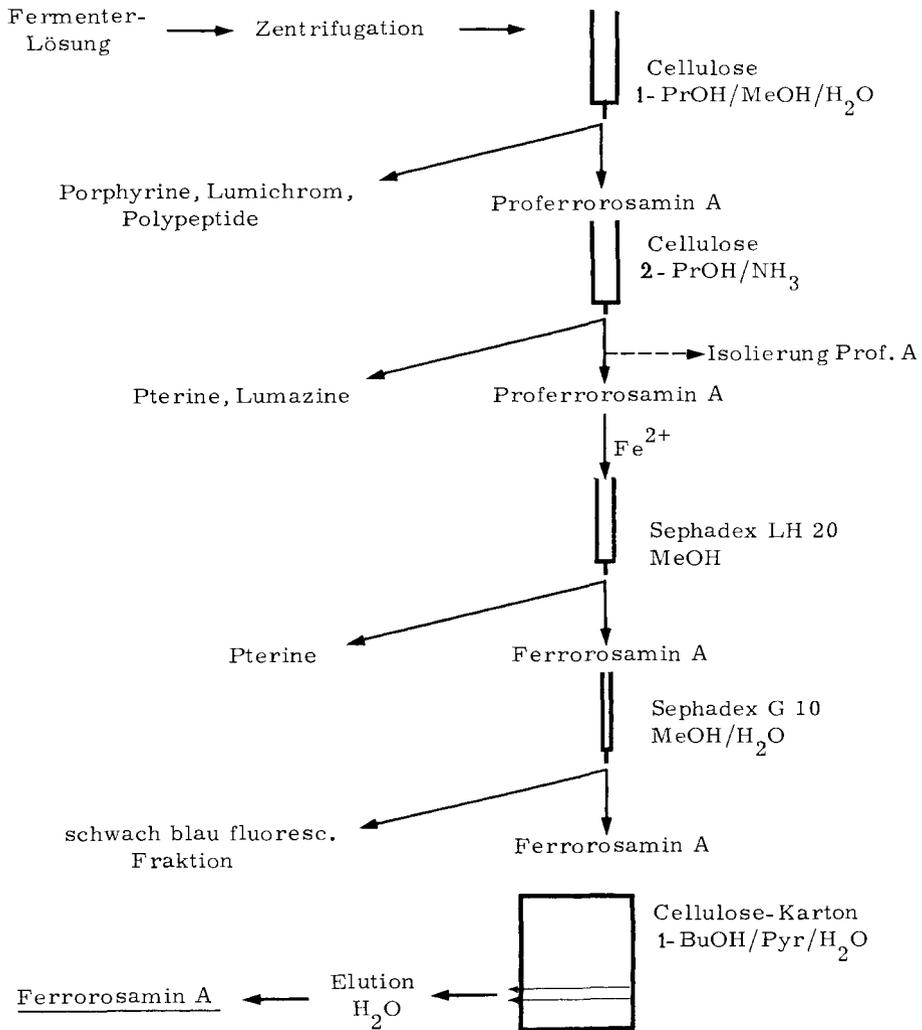


Fig. 4. Proferrerosamin-Bildung bei den in Fig. 3 wiedergegebenen pH-Bedingungen A-E

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  $\text{Fe}^{2+}$  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  $\text{Fe}^{2+}$  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 Frl. *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 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,1 g FeSO<sub>4</sub>, 0,4 g CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 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 Fe<sup>2+</sup>-freien Substanzen verwendet: 30,0 g Glycerin (87%), 10,8 g L-Asparagin, 3,0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,0 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O und 0,48 g CaCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O. 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% NH<sub>3</sub> 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 HF<sub>254</sub>, *Merck*) nachweisbar [Rf 0,55 (2-Propanol/1proz. NH<sub>3</sub>-Lösung 2:1); Rf 0,58 (Äthanol/konz. Salzsäure 30:0,1)].

Das rohe Proferrorosamin (I) wird mit Fe<sup>2+</sup> 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. NH<sub>3</sub>-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).