

Isolierung von 3-Hydroxyanthranilsäure aus dem Kulturmedium chloridazonabbauender Bakterien

Isolation of 3-Hydroxy-anthranilic Acid from the Culture Medium of Chloridazon Degrading Bacteria

Robert Buck und Franz Lingens

Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim, Garbenstr. 30, D-7000 Stuttgart 70

Z. Naturforsch. **35 c**, 838–839 (1980);
received June 13, 1980

Chloridazon Degrading Bacteria, 3-Hydroxy-anthranilic Acid, Tryptophan Metabolism, Induction of Anthranilate Synthase

3-Hydroxyanthranilic acid could be isolated from the culture medium of chloridazon degrading bacteria growing under supplementation with phenylalanine. Anthranilate synthase is induced by phenylalanine.

Kürzlich konnten wir zeigen, daß chloridazonabbauende Bakterien Phenylalanin auf einem bisher noch nicht beschriebenen Wege abbauen [1].

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung von 3-Hydroxyanthranilsäure aus dem Medium dieser Bakterien beschrieben, die sich nur nachweisen läßt, wenn unter Zusatz von Phenylalanin gezüchtet wird.

Bakterienstamm: Der Stamm N der chloridazonabbauenden Bakterien aus der Stammsammlung des Instituts wurde verwendet.

Kulturmedium: Das Mineralsalzmedium enthielt in 1000 ml deion. Wasser:

0,875 g KH_2PO_4 , 0,125 g K_2HPO_4 ,
0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g NaCl , 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 mg H_3BO_3 ,
0,04 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg KI ,
0,3 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,
0,4 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 mg $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$,
0,1 mg Biotin und 0,03 mg Cyanocobalamin.

Diesem Mineralsalzmedium wurden 3,6 mmol L-Phenylalanin zugesetzt, und anschließend wurde der pH-Wert mit 2,5 N NaOH auf 6,8 eingestellt. Bei 121 °C wurde 15 min autoklaviert.

Züchtungsbedingungen: 0,1 l Phenylalanin-Medium im 250 ml Erlenmeyer-Kolben wurde mit

einer Impföse Bakterienzellen beimpft und bei 30 °C 2 Tage lang geschüttelt. Diese Kultur wurde anschließend in einen 2-l-Kolben mit 1 l Phenylalanin-Medium transferiert und 26 h bei 30 °C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde ein 10-l-Fermenter angeimpft, der 36 h bei 30 °C gerührt und belüftet wurde. Danach wurden die Zellen bei 4 °C und $9000 \times g$ in 30 min abzentrifugiert und mit Mineralsalzmedium gewaschen.

„Resting-cells“-Versuche: Frische, in der logarithmischen Wachstumsphase geerntete Zellen wurden in 2,3 l Akkumulationsmedium (Mineralsalzmedium mit 11,4 mmol/l L-Phenylalanin) suspendiert und bei 30 °C unter starker Luftzufuhr inkubiert. Nach Metabolisierung von ca. 50% des eingesetzten Substrates wurden die Bakterien durch Zentrifugation aus dem Medium entfernt.

Isolierung der 3-Hydroxyanthranilsäure: Das Medium wurde auf pH 2 angesäuert, zur Trockene eingedunstet und der Rückstand mit Ethanol extrahiert. Der Extrakt wurde konzentriert, in wenig Ethanol/Wasser 50:50 aufgenommen und über eine Sephadex-LH-20-Säule (100×5 cm) aufgetrennt. Als Elutionsmittel diente ein Gemisch aus gleichen Teilen Ethanol und Wasser. Das fraktionierte Säuleneluat wurde dünnschichtchromatographisch und UV-spektroskopisch auf 3-Hydroxyanthranilsäure untersucht. Die Fraktionen mit dem gereinigten Metaboliten wurden zur Trockene eingedunstet.

Dünnschichtchromatographie: Fertigplatten (25×25 cm) mit Kieselgel 60 F₂₅₄ von Merck wurden verwendet. Als Laufmittel dienten:

Isopropanol/Wasser/Ammoniak (20/2/1) und
Chloroform/Ethanol (40/60).

Substanzflecken wurden mit UV-Licht lokalisiert und die 3-Hydroxyanthranilsäure mit Ehrlichs Reagenz nachgewiesen.

Bei „resting-cells“-Versuchen mit Phenylalanin als Substrat wurde nach Auftrennung des Akkumulationsmediums an einer Sephadex-LH-20-Säule (100×5 cm) 3-Hydroxyanthranilsäure in den Fraktionen 240–250 eluiert. Die isolierte Substanz und authentische 3-Hydroxyanthranilsäure zeigten bei der Dünnschichtchromatographie gleiche R_F -Werte in verschiedenen Laufmitteln: 0,58 (in I) und 0,68 (in II). Beim Besprühen mit Ehrlichs Reagenz wurde eine charakteristische Farbreaktion erhalten. Beim UV-spektroskopischen Vergleich besaßen die isolierte und authentische 3-Hydroxyanthranilsäure

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. F. Lingens.
0341-0382/80/0900-0838 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

gleiche Maxima bei 298 nm (pH 3) oder 333 nm (pH 12). Die Identität der isolierten 3-Hydroxyanthranilsäure wurde weiterhin über IR- und MS-Spektroskopie gesichert. Aus dem Wachstumsmedium konnte keine 3-Hydroxyanthranilsäure isoliert werden, sie trat nur unter „resting-cells“-Bedingungen mit Phenylalanin auf. Da die 3-Hydroxyanthranilsäure offensichtlich aus Tryptophan gebildet wird, erhebt sich die Frage, ob Phenylalanin in irgendeiner Weise die Biosynthese des Tryptophans stimuliert. Es wurde deshalb geprüft, ob Phenylalanin das erste Enzym der Tryptophanbiosynthese, die Anthranilatsynthase, aktiviert oder induziert. Nach Anzucht der Bakterien unter Zusatz von Phenylalanin konnte tatsächlich eine vermehrte Bildung von An-

thranilatsynthase im Vergleich zum phenylalanin-freien Medium nachgewiesen werden.

Als plausible Erklärung für die Bildung von 3-Hydroxyanthranilsäure bietet sich demnach die Stimulierung der Tryptophanbiosynthese durch Phenylalanin an, die nachfolgend zu einer vermehrten Bildung von 3-Hydroxyanthranilsäure führt.

Danksagung

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für Unterstützung unserer Arbeiten und Susanne Weiß für die sorgfältige technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche.

[1] R. Buck, J. Eberspächer u. F. Lingens, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **360**, 957–969 (1979).