

# Zur Genese der amidisch an den Chromophor von Pyoverdinen gebundenen Dicarbonsäuren [1]

On the Genesis of the Dicarboxylic Acids Bound Amidically to the Chromophor of the Pyoverdins [1]

H. Schäfer, K. Taraz und H. Budzikiewicz

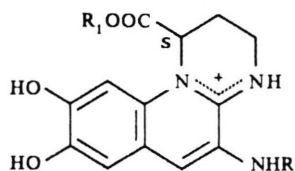
Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln, Greinstraße 4, D-5000 Köln 41, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **46c**, 398–406 (1991); received December 21, 1990/March 13, 1991

\*Pyoverdins, Biogenesis, Transformations, Citric Acid Cycle, *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas* strains of the so-called fluorescent group usually produce several pyoverdins which differ only in the nature of a dicarboxylic acid bound amidically to the chromophor. For the pyoverdins isolated from the culture medium of *Pseudomonas fluorescens* 12 it is shown that succinic acid is an artefact formed by hydrolysis of succinic amide, and that  $\alpha$ -ketoglutaric acid is transformed enzymatically to glutamic acid. This process is reversed after the phase of exponential growth of the bacteria. The ratio  $C_4$ - vs.  $C_5$ -acids changes with the culture time and with increasing  $Fe^{3+}$  content of the medium in favor of the latter.

Alle bisher isolierten Peptidsiderophore der sogenannten Fluoreszentengruppe der Gattung *Pseudomonas* (meist als Pyoverdine, gelegentlich auch als Pseudobactine bezeichnet [2–13]) enthalten amidisch an die  $NH_2$ -Gruppe des Chromophors (**1**) gebunden eine Dicarbonsäure bzw. de-



**1:**  $R_1$  ... Peptidkette,  $R$  ... Dicarbonsäure(amid) (Bernsteinsäure(amid): Suc bzw. Suca, Glutaminsäure: Glu, 2-Ketoglutarinsäure; Kgl).

ren Amid. Gefunden wurden bisher Äpfelsäure(amid) [4, 9], Bernsteinsäure(amid) [1, 5], Glutaminsäure [12] und 2-Ketoglutarinsäure [6, 7]. Die Verknüpfung über die  $\beta$ - (Äpfelsäureamid [4, 11]) bzw.  $\gamma$ -Carboxylgruppe (Glutamin- [12] und Ketoglutarinsäure [5, 6, 12]) wurde auf spektroskopischem und/oder chemischem Weg nachgewiesen. Die in der Literatur gelegentlich formulierte Verknüpfung über die  $\alpha$ -Carboxylgruppen ist entwe-

der nicht bewiesen [9, 10] oder – wie im Falle des Pyoverdins PaB [10] – (= Pyoverdin C [7]) falsch. Gewöhnlich findet man Gemische von Pyoverdinen, die sich nur in der Dicarbonsäure voneinander unterscheiden, deren relatives Verhältnis aber vom Zeitpunkt des Abbruchs der Bakterienkulturen abhängt. Wir möchten hier über eine systematische Untersuchung der Abhängigkeit dieses Verhältnisses von der Kulturdauer, dem  $Fe^{3+}$ -Gehalt und dem pH-Wert der Kultur von *Pseudomonas fluorescens* 12 berichten. Der von uns untersuchte Stamm produziert Pyoverdine [12], die Bernsteinsäure, Bernsteinsäureamid, Glutaminsäure und 2-Ketoglutarinsäure (im folgenden als Pyo-Suc, -Suca, -Glu und -Kgl bezeichnet) in vergleichbaren Mengen enthalten. Damit sollte auch die Frage gelöst werden, ob die einzelnen Pyoverdine auseinander entstehen oder unabhängig voneinander gebildet werden.

## Probenvorbereitung und Meßmethodik

*Pseudomonas fluorescens* 12 wurde wie im Exp. Teil näher beschrieben gezüchtet. Da – wie gezeigt werden soll – sowohl die Gesamtausbeute an Pyoverdinen als auch deren relatives Verhältnis zueinander stark von der Eisenmenge im Kulturmedium abhängt, wurde das Gluconat als Hauptquelle für  $Fe^{3+}$  durch Ionenaustauschchromatographie vollständig von Eisenionen befreit und anschließend mit definierten Mengen an  $Fe^{3+}$  versetzt. Das übli-

Reprint requests to Prof. Dr. H. Budzikiewicz.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen  
0939–5075/91/0500–0398 \$ 01.30/0



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.

cherweise für Kulturmedien verwendete  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat, das ein Ausfallen von kolloidalem Eisenhydroxid verhindert, kann hier nicht eingesetzt werden, da das Citrat-Ion selbst als Komplexbildner und möglicherweise auch als Siderophor fungiert [14, 15].  $\text{FeCl}_3$  führt während des Autoklavierens zur Abscheidung von  $\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ . Mit UV-Licht sterilisiertes  $\text{FeCl}_3$  wurde daher in sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst unmittelbar vor dem Animpfen der Kulturlösung zugesetzt. Um ein Umstellen des Stoffwechsels zu vermeiden, wurden die Hauptkulturen aus einer zweimal umgeimpften Flüssigkultur, in der sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, angeimpft.

Die Zelldichte der einzelnen Kulturen wurde durch Messung der scheinbaren Extinktion [16] bei 675 nm ( $E_{675}$ , bei dieser Wellenlänge absorbiert keiner der Inhaltsstoffe der Kulturlösung) bestimmt. Die Extinktion beim Extinktionsmaximum ( $\sim 400$  nm) der  $\pi$ ,  $\pi^*$ -Bande ( $E_{400}$ ) diente als Maß für die Pyoverdinkonzentration. Die Wellenlänge des Maximums ist etwas pH-abhängig, ebenso verändert sich der Extinktionskoeffizient mit dem pH. Es wurde daher eine Eichkurve bestimmt, derzufolge  $E_{400}$  mit steigendem pH bis zu einem Maximum (105,2%) bei pH 7,9 ansteigt und dann wieder abfällt. Die gemessenen Extinktionswerte wurden daher auf pH 7,0  $\pm$  100% umgerechnet.

Die quantitative Bestimmung der einzelnen Pyoverdin-Komponenten als Eisenkomplexe erfolgte durch Integration der HPLC-Chromatogramme, wobei die Probenmengen in Abhängigkeit von  $E_{400}$  so gewählt wurden, daß es bei der Aufarbeitung der Proben (s. Exp. Teil) zu keinem Überladen der Sep-Pak RP-18-Kartuschen kam. Mit Hilfe exakt eingewogener reiner Ferri-Pyoverdine wurden die Response-Faktoren für die vier Komponenten bestimmt. Durch analoge Aufarbeitung der Kulturlösungen und eines Pyoverdin-Standards konnte gezeigt werden, daß bei der Aufarbeitung keine Verluste auftreten und es dabei auch zu keiner Umwandlung der einzelnen Ferri-Pyoverdine ineinander kommt. Die Reproduzierbarkeit der Mengen wurde durch Züchten von jeweils 3 Parallelkulturen unter gleichen Wachstumsbedingungen überprüft; die Meßwerte der 3 Ansätze wurden anschließend gemittelt. Die Standardabweichung des Gesamt-Pyoverdingehaltes betrug bei parallel aufgearbeiteten Proben 2,5%, die der relativen Anteile 0,3%.

## Hydrolyse-Vorversuche

Da Suca-Pyoverdine unter milden basischen Bedingungen zu Suc-Pyoverdinen hydrolysiert werden, war bereits früher vermutet worden [5, 8], daß es sich bei letzteren (wenigstens z. T.) um Artefakte handelt. Zur Überprüfung der Parameter, die die Hydrolyse beeinflussen, wurde eine Lösung von Ferri-Pyo-Suca 6 Tage bei pH 8,2 aktiv belüftet (vgl. Exp. Teil, Bakterienkultur). Dabei gingen etwa 2/3 in Ferri-Pyo-Suc über, während die Summe beider konstant blieb. Bei niedrigen pH-Werten nimmt die Hydrolyserate ab: Bei pH 5,5 haben sich nach 8 Tagen nur 5% Ferri-Pyo-Suc gebildet. Ferri-Pyo-Kgl und -Glu verändern sich unter gleichen Bedingungen nicht. Auch eisenfreies Pyo-Suca wird hydrolysiert, daneben kommt es aber zu Zersetzung der Pyoverdine.

## Ergebnisse

### Vorbemerkungen

Einen direkten Hinweis darauf, ob ein Pyoverdin ein Primär- oder ein Folgeprodukt ist, geben die Ansätze der Verlaufskurven ihrer prozentualen Anteile, die man durch Extrapolation auf  $t = 0$  erhält ( $t_0$ -Werte): Liegen diese deutlich im positiven Bereich, so handelt es sich um ein Primärprodukt; liegen sie bei Null, um ein Folgeprodukt. Diese Überlegung gilt allerdings nur, wenn in der Anlaufphase die Pyoverdinproduktion groß ist, so daß Umwandlungen vernachlässigt werden können. Dies ist nicht der Fall bei Kulturen mit hohem Eisengehalt (vgl. unten), bei denen die Pyoverdinproduktion minimal ansteigt und damit Umwandlungsprozesse bereits gebildeter Pyoverdine deutlich werden (vgl. Abb. 3 – Glu und Suc).

Überdies sollte die Gehaltskurve (Definition s. unten) eines Pyoverdins, das sich irreversibel in ein anderes umwandelt, relativ früh ein Maximum durchlaufen, während die Gehaltskurve der Folgeprodukte über diesen Punkt hinaus bis in die Zersetzungsphase der Pyoverdine hinein ansteigt und erst spät ihr Maximum durchläuft.

### Zeitabhängigkeit

In den Abb. 1–4 sind in Abhängigkeit von dem Wachstumswert die folgenden Meßwerte angegeben:

a) Zellwachstum gemessen als  $E_{675}$ , Pyoverdinproduktion gemessen als  $E_{400}$  und pH des Mediums.

b) Die gebildeten Mengen (in mg/l) an Pyoverdin-Glu, -Kgl, -Suca und -Suc sowie deren Summe (Gehalt-Kurven). Daß die  $E_{400}$ -Kurve a) und die Summenkurve b) während der Zersetzungsphase nicht parallel laufen (besonders deutlich in Abb. 1 und 2), hat seinen Grund darin, daß die Summenkurve nur die vier intakten Pyoverdine erfaßt, die  $E_{400}$ -Kurve jedoch zusätzlich Zersetzungsprodukte und eventuelle Vorläufer.

c) Den prozentualen Anteil der vier genannten Pyoverdine (Anteilkurven).

*Pyo-Suca/-Suc.* Pyo-Suca erfüllt die oben angegebenen Kriterien für ein Primärprodukt: Der pro-

zentuale Anteil liegt in eisenfreiem Medium (Abb. 1) bei  $t_0$  bei 67% und fällt dann exponentiell ab; die Gehaltkurve erreicht nach 20 h ein Maximum, das für 60 h beibehalten wird (steady state), und fällt dann wieder ab, während die Summe der Pyoverdine noch zunimmt. Pyo-Suc ist dagegen eindeutig ein Folgemetabolit: Seine Anteilkurve beginnt bei  $t_0$  bei Null und steigt ständig an, während die Gehaltkurve ein flaches Maximum erst nach 135 h durchläuft. Bei Zusatz von 15  $\mu\text{g/l}$   $\text{Fe}^{3+}$  (Abb. 2) sind die Ergebnisse analog; bei 50  $\mu\text{g/l}$   $\text{Fe}^{3+}$  (Abb. 3) erfolgt die Pyoverdinproduktion so langsam, daß Extrapolation auf  $t_0$  4% Pyo-Suc ergibt (Diskussion s.o.); bei 100  $\mu\text{g/l}$  ist die Pyoverdinproduktion so gering, daß eine Bestimmung der Gehalts- und Anteilskurven wegen der Meß-

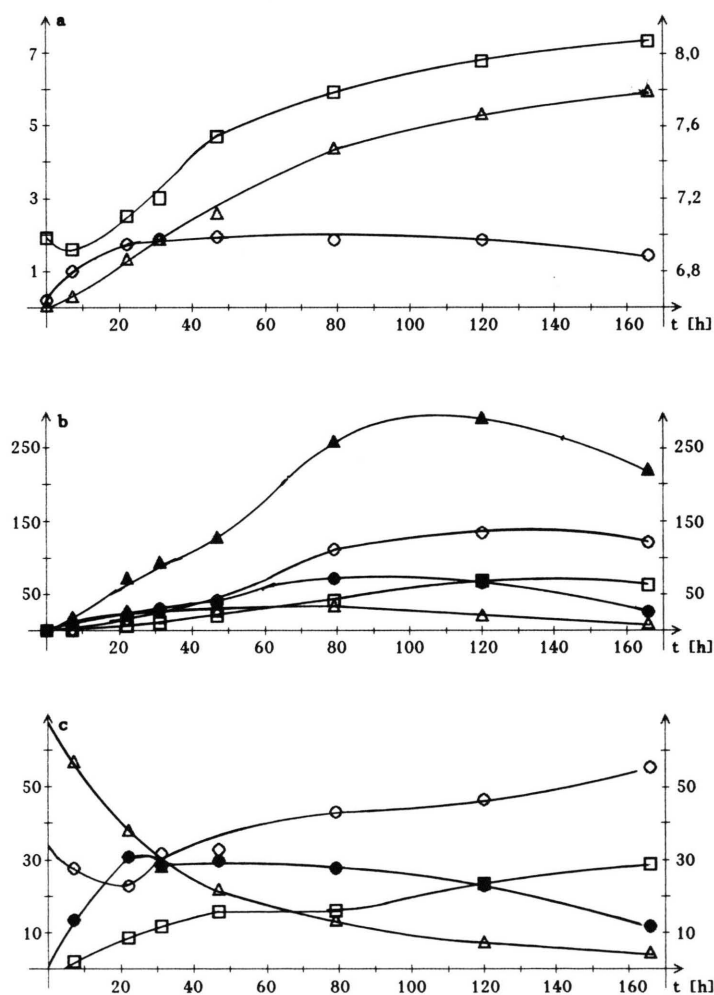


Abb. 1. Zellwachstum und Pyoverdinproduktion bei Zucht ohne Eisenzusatz zum Kulturmedium.

a)  $E_{675}$  (○) und  $E_{400}$  (△): linke Skala, pH-Wert, (□): rechte Skala;  
b) Pyoverdingehalt (mg/l) (Pyo-Glu ●, -Kgl ○, -Suc □, -Suca △, Summe ▲);  
c) Pyoverdinanteile (%) (Symbole wie bei b).

ungenauigkeiten nicht erfolgte. In Verbindung mit den Ergebnissen der Hydrolyseversuche folgt aus dem Kurvenverlauf, daß Pyo-Suc ein aus Pyo-Suca entstandenes Artefakt ist.

*Pyo-Kgl/-Glu.* Die reduktive Aminierung von Kgl zu Glu spielt bei der Proteinbiosynthese in Bakterien eine wichtige Rolle [17]. Ein analoger Zusammenhang könnte daher auch bei der Pyoverdinbiosynthese bestehen. Die  $t_0$ -Werte der Anteilskurven weisen Pyo-Kgl als Primär- und -Glu als Folgeprodukt aus (bzgl. Abb. 3 vgl. oben). Zu

Beginn des Bakterienwachstums nimmt der prozentuelle Anteil an Kgl auch ab und der von Pyo-Glu zu, im weiteren Verlauf kehrt sich jedoch (z. U. von dem Paar Pyo-Suca/-Suc) der Trend wieder um, wobei die beiden Kurven praktisch symmetrisch zueinander verlaufen. Daraus läßt sich ableiten, daß zwar Pyo-Glu als Folgeprodukt aus Pyo-Kgl gebildet wird, daß aber zwischen beiden Säuren ein Gleichgewicht besteht, welches sich mit zunehmender Wachstumsdauer wieder zu Pyo-Kgl hin verschiebt. Dies mag der Grund sein,

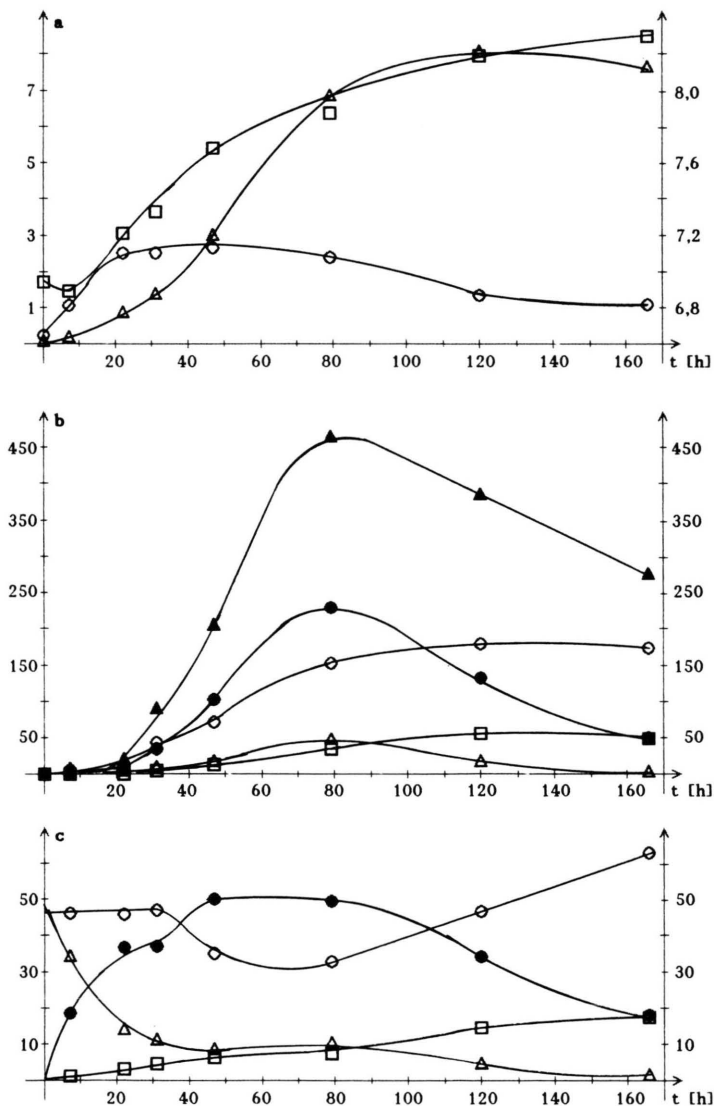


Abb. 2. Zellwachstum und Pyoverdinproduktion nach Zusatz von 15 µg/l  $\text{Fe}^{3+}$  zum Kulturmedium.

- a)  $E_{675}$  (○) und  $E_{400}$  (△): linke Skala, pH-Wert, (□): rechte Skala;  
 b) Pyoverdingehalt (mg/l) (Symbole wie bei Abb. 1);  
 c) Pyoverdinanteile (%) (Symbole wie bei Abb. 1).

daß die Glu-Pyoverdine bisher nicht gefunden worden sind (Aufarbeitung am Ende der Wachstums- bzw. während der Abbruchphase, wenn  $E_{400}$  ein Maximum erreicht hat).

#### *Einfluß der $Fe^{3+}$ -Konzentration im Medium*

Die wichtigsten Ergebnisse sind in Tab. I zusammengestellt. Einmal fällt auf, daß die Teilungsrates der Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase mit zunehmender  $Fe^{3+}$ -Konzentration größer wird. Dies führt zu einer größeren Zelldichte in der stationären Phase und durch den dadurch erhöhten Nährstoffverbrauch zu einem schnelleren Absterben der Bakterien. Mit zunehmender  $Fe^{3+}$ -Konzentration verlängert sich auch die An-

laufphase der Pyoverdinproduktion. Eine intensive Pyoverdinproduktion beginnt anscheinend erst, wenn alles frei verfügbare Eisen aufgenommen ist und es dadurch zu Mangelbedingungen kommt. Daß die maximale Pyoverdinproduktion nicht bei dem Kulturanatz ohne Eisenzugabe, sondern vielmehr bei Zugabe von  $15 \mu\text{g/l}$  liegt, ist auf das stark reduzierte Zellwachstum in den eisenfreien Kulturen zurückzuführen. Während die eben geschilderten Ergebnisse nur die Notwendigkeit einer ausreichenden Eisenversorgung für das Zellwachstum und das Einsetzen einer intensiven Pyoverdinproduktion nur bei Eisenmangel bestätigen, ist die folgende Beobachtung für das Thema dieser Arbeit von Interesse: Der prozentuelle Anteil an

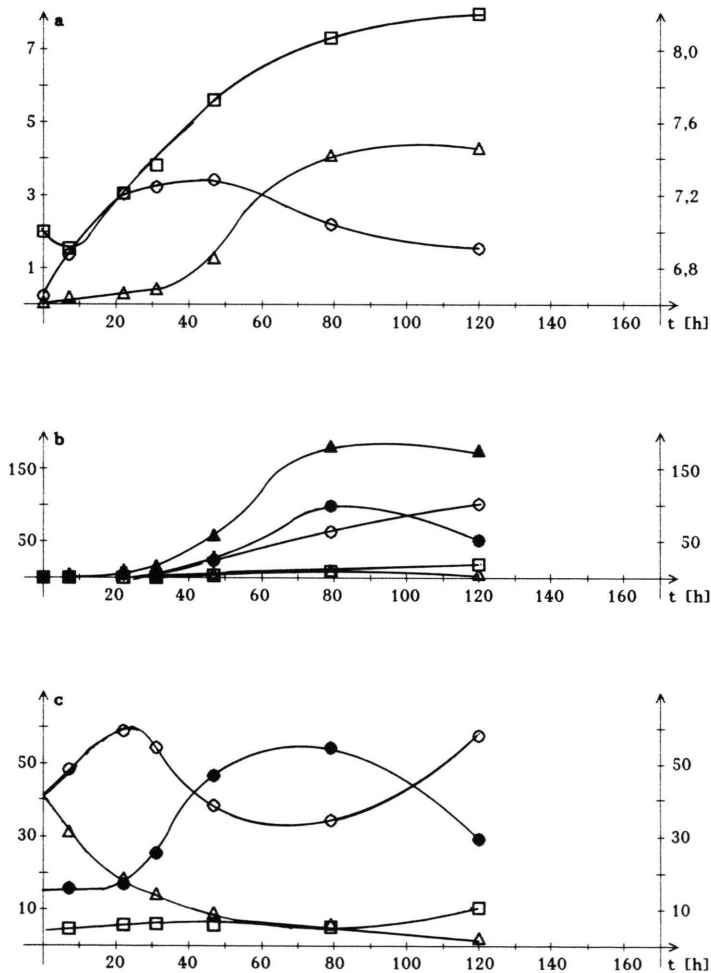


Abb. 3. Zellwachstum und Pyoverdinproduktion nach Zusatz von  $50 \mu\text{g/l}$   $Fe^{3+}$  zum Kulturmedium.

a)  $E_{675}$  (O) und  $E_{400}$  ( $\Delta$ ): linke Skala, pH-Wert, ( $\square$ ): rechte Skala;  
b) Pyoverdingehalt (mg/l) (Symbole wie bei Abb. 1);  
c) Pyoverdinanteile (%) (Symbole wie bei Abb. 1).

Tab. I. Abhängigkeit verschiedener Parameter von der Menge an der Kulturlösung zugesetztem  $\text{Fe}^{3+}$ .

Zugabe $\text{Fe}^{3+}$ [ $\mu\text{g/l}$ ]	$E_{675}$ (Max)	Beginn Absterbephase [h]	Dauer Anlaufphase [h] Pyo-Produktion	max. Pyo-Gehalt [mg/l]	Anteil an Säuren [%]			
					$t_0$ $C_4$	$C_5$	$t_{120}$ $C_4$	$C_5$
0	1.9	120	1	286	67	33	31	69
15	2.6	60	22	455	53	47	19	81
50	3.4	50	40	176	44	56	13	87
100	4.5	50	45	27				

$C_4$ -Säuren (Pyo-Suca + -Suc) gegenüber  $C_5$ -Säuren (Pyo-Kgl + -Glu) nimmt im Verlauf des Zellwachstums, aber auch mit zunehmender Eisenkonzentration ab. Eine Erklärung hierfür können wir derzeit noch nicht geben.

Einfluß des pH-Wertes des Kulturmediums

Überläßt man die Bakterienkulturen sich selbst, so fällt der pH-Wert des Kulturmediums erst leicht ab und steigt dann bis auf etwa 8,1 an. *Pseudomo-*

*nas fluorescens* 12 durchläuft somit zwei Stoffwechselphasen, wobei erst saure und anschließend überwiegend basische Metaboliten in das Medium abgegeben werden. Um den Einfluß des sich ändernden pH-Wertes auf die Pyoverdinproduktion zu überprüfen, wurde bei einer Kultur ohne Eisenzugabe der pH-Wert durch Zugabe von KOH bzw. HCl bei etwa 7,8 konstant gehalten (s. Abb. 5). Das allgemeine Bild unterscheidet sich nicht von den bisherigen Ergebnissen (vgl. insb. Abb. 1). Die Ausbeute an Pyoverdinen ist etwas

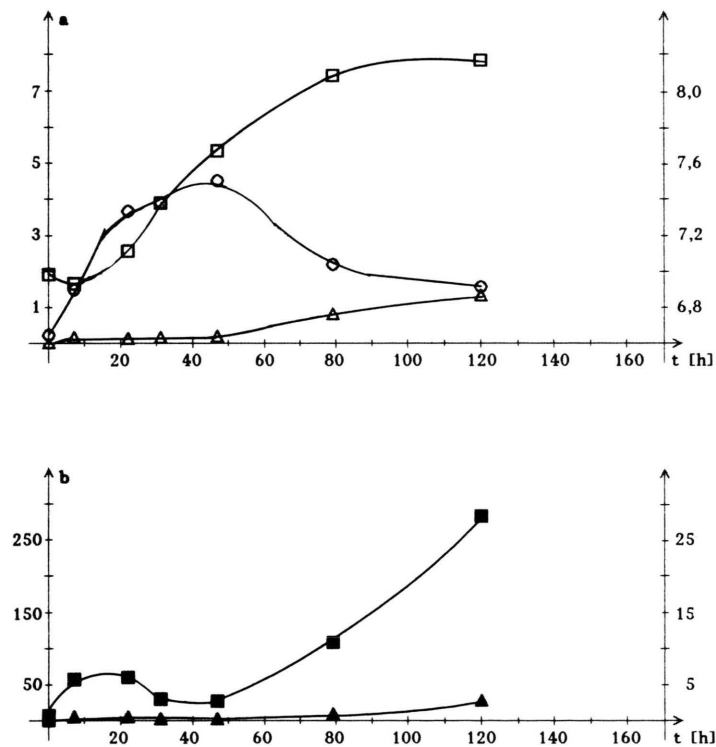


Abb. 4. Zellwachstum und Pyoverdinproduktion nach Zusatz von 100  $\mu\text{g/l}$   $\text{Fe}^{3+}$  zum Kulturmedium.  
a)  $E_{675}$  (○) und  $E_{400}$  (△): linke Skala, pH-Wert, (□): rechte Skala;  
b) Pyoverdingehalt (mg/l) (▲ linke Skala zum Vergleich mit Abb. 1–3, ■ rechte Skala 10fach verstärkt).



geringer, was auf ihre stärkere Zersetzung bei höheren pH-Werten sowie die früher einsetzende Absterbephase der Bakterien zurückzuführen ist. Auch die Umwandlung von Pyo-Suca in Pyo-Suc erfolgt dem basischen Milieu entsprechend rascher.

### Schlußfolgerungen

Pyo-Suca und Pyo-Kgl sind offensichtlich genuine Primärprodukte. Während Pyo-Suca irreversibel zu Pyo-Suc hydrolysiert wird (und letzteres daher als Artefakt anzusehen ist), geht zwar Pyo-Kgl partiell durch reduktive Transaminierung in Pyo-Glu (welches damit genuin, aber ein Folgeprodukt ist) über, die beiden Säuren stehen jedoch miteinander in einem (enzymkatalysierten) Gleich-

gewicht, das sich im Laufe des Bakterienwachstums ständig verschiebt. Die bisher bei Pyoverdinen gefundenen Säuren Kgl, Suc und Äpfelsäure gehören dem Zitronensäure-Zyklus an. Die Veränderung des prozentualen Anteils von C<sub>4</sub>- gegenüber C<sub>5</sub>-Säuren mit der Wachstumsdauer der Bakterien sowie dem Fe<sup>3+</sup>-Gehalt des Mediums könnte damit in einer Beeinflussung der Regelmechanismen dieses Zyklus liegen.

### Experimenteller Teil

#### Geräte

UV/Vis: Perkin-Elmer Hitachi 200; pH-Elektrode: Schott CG 801; HPLC: Pumpe Knauer FR-30; Detektor Kontron Uvikon 725; Zentrifuge Christ Simplex.

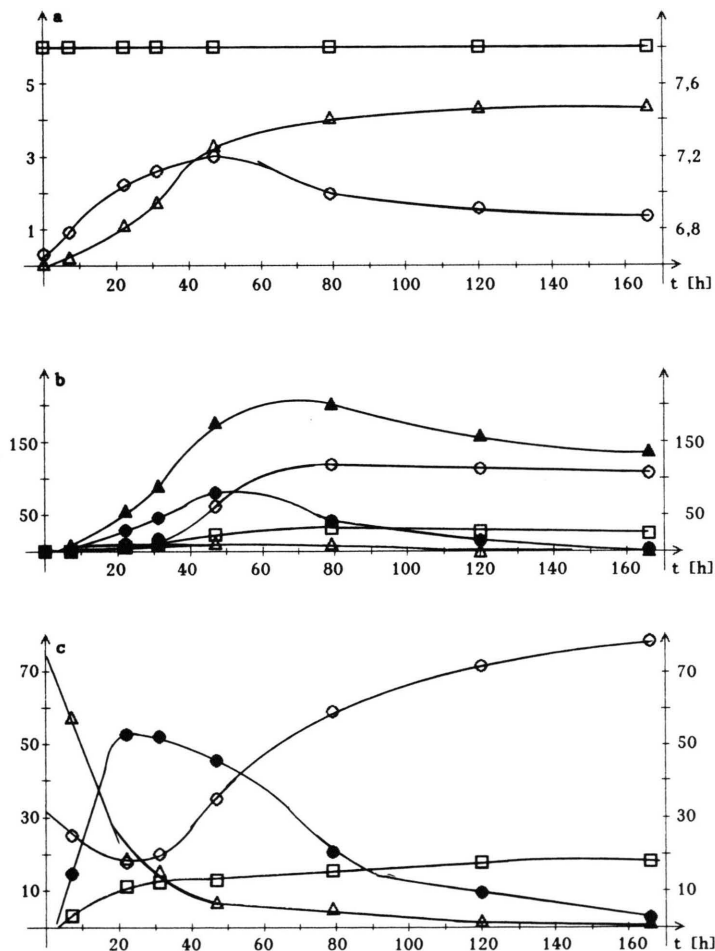


Abb. 5. Zellwachstum und Pyoverdineproduktion bei Zucht ohne Eisenzusatz und bei konstant gehaltenem pH.

a)  $E_{675}$  (○) und  $E_{400}$  (△): linke Skala, pH-Wert, (□): rechte Skala;  
b) Pyoverdinegehalt (mg/l) (Symbole wie bei Abb. 1);  
c) Pyoverdineanteile (%) (Symbole wie bei Abb. 1).

### Einstellung des Eisengehaltes der Kulturlösungen

Die für das Kulturmedium verwendete Na-Gluconat-Lösung wurde durch Ionenaustauschchromatographie (Säule  $3,2 \times 55$  cm) an Chelite C (0,3–0,8 mm) (Serva) bei einem pH-Wert von 6,25 von allen mehrwertigen Ionen befreit. (Es empfiehlt sich, nach der Benutzung Reste von Gluconat mit viel Wasser von der Säule zu entfernen, um einen Bakterienbefall zu vermeiden. Bezüglich einer Regeneration s. die Firmenangaben).  $\text{FeCl}_3$  wurde als Feststoff 15 h mit UV-Licht bestrahlt und unmittelbar vor Zugabe zum sterilisierten Kulturmedium in sterilem Wasser gelöst. Zur Züchtung wurden nur Gefäße aus eisenfreiem Glas verwendet, die durch dreimaliges Spülen mit konz. HCl und Waschen mit Wasser gereinigt worden waren. Wasser ist stets voll entsalzt und bidest.

### Bakterienkultur

Die Lösungen (1) von 13,0 g vorbehandelten (s.o.) Na-D(+)-Gluconat in 800 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , (2) 5,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0,5$  g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und (3) 4,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4 + 2,65$  ml 40-proz. KOH, pH 7,2, in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  wurden getrennt 20 min bei  $130^\circ\text{C}$  und  $2 \text{ kp/cm}^3$  sterilisiert und heiß im Fermenter vereinigt (pH der abgekühlten Lösung 7,1). Die Stammkultur von *Pseudomonas fluorescens* 12 wurde monatlich mit einer Eisenöse auf Agarplatten (Medium wie oben unter Zusatz von 20 g Agar und 8 ml 0,5-proz. Eisencitratlösung/l) umgeimpft, 30 h bei  $30^\circ\text{C}$  bebrütet und bei  $5^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Hauptkulturen (11 in einem 3-l-Fermenter) wurden aus mehrfach umgeimpften Flüssig-Schüttelkulturen (jeweils 250 ml, Wachstumszeiten von 33, 48 und 15 h, Animpfen der ersten Kultur mit einer Platinöse voll Bakterienschleim von einem Agarplatte, der 2. und 3. mit je 10 ml, die Hauptkultur mit 50 ml der jeweiligen Vorgängerkultur) erhalten. Über Isolierung, Reinigung und Strukturaufklärung der Pyoverdine wird a.a.O. berichtet [12].

### Meßmethodik

**Scheinbare Extinktion  $E_{675}$ .** Aus dem Ablauf des Fermenters wurden die ersten 10–12 ml verworfen und die folgenden 11 ml in ein Reagenzglas mit Stopfen gebracht. Dieses wurde 4mal so umgedreht, daß eine Gleichverteilung der Zellsuspension ohne Luftblasen- oder Schaumbildung er-

reicht wurde. 1 ml der Suspension wurde zur Bestimmung von  $E_{675}$  auf das 10fache verdünnt. Die so bestimmten Extinktionswerte finden sich in den Abb. und der Tab. I. Die Extinktion des zellfreien Mediums (s.u.) war  $\leq 0,02$ .

**pH-Wert.** Die verbleibenden 10 ml Suspension wurden 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, die Flüssigkeit dekantiert und nochmals 30 min zentrifugiert. 2 ml des klaren Zentrifugats wurden zur pH-Wert-Bestimmung verwendet.

**Extinktion  $E_{400}$ .** 1 ml des Zentrifugats wurde auf das 10fache verdünnt und die Extinktion beim Maximum im Bereich von 400–404 nm bestimmt. Bezüglich der Korrektur für die pH-Abhängigkeit der  $E_{400}$  s. Hauptteil.

**Quantitative Bestimmung der Pyoverdine.** Entsprechend der  $E_{400}$  wurden Mengen von 2–5 ml des Zentrifugats mit 0,5 ml einer 1-proz. Eisencitrat-Lösung versetzt und mit 0,5 M HCl auf pH  $5,5 \pm 0,2$  eingestellt. Diese Proben können einige Tage bei  $4^\circ\text{C}$  ohne Veränderung der Zusammensetzung gelagert werden. Zur Entfernung von restlichem Zellmaterial sowie anderen irreversibel an die HPLC-Säulen bindenden Substanzen wurden die Proben durch 2 hintereinander geschaltete Sep-Pak RP-18-Kartuschen (Waters) [18, 19] (vorbehandelt mit 5–10 ml konz. HCl in  $\text{CH}_3\text{OH}$  (4,6:1000) und anschließend mit 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) filtriert. Die Probengefäße wurden dreimal mit 0,75 ml 0,03 M Phosphatpuffer (pH 5,5) gespült; die Spülflüssigkeiten gleichfalls auf die Kartuschen aufgebracht, auf die anschließend noch 4 ml des Puffers und 0,8 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (zur Entfernung löslicher Salze) aufgegeben wurden. Die an dem RP-Material der Kartuschen adsorbierten Pyoverdine konnten dann mit 1mal 5 ml und 2mal 1 ml 20-proz.  $\text{CH}_3\text{OH}$  eluiert werden. Das Eluat wurde im Wasserstrahlvakuum bei  $25^\circ\text{C}$  zur Trockene eingedunstet. Die Trennung der Ferri-Pyoverdine erfolgte durch HPLC isokratisch an Nucleosil 7 C<sub>18</sub> (Macherey & Nagel) mit einem 0,035 M Citratpuffer in 5 Vol. %  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (pH 5,0). Das Laufmittel, hergestellt mit voll entsalztem und aus Glasgefäßen bidest.  $\text{H}_2\text{O}$ , wurde 30 min im Ultraschallbad entgast. Flußrate 1 ml/min, Detektion bei 390 nm.

### Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. G. Pulverer und Herrn Dr. H. Korth, Institut für Medizinische Mikrobi-



logie und Hygiene der Universität zu Köln, möchten wir für die Überlassung des Bakterienstammes, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem

Fonds der chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung bestens danken.

- [1] Teil XLIII der Reihe „Bakterieninhaltsstoffe“, für Teil XLII s. G. Mohn, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **45b**, 1437 (1990).
- [2] M. Teintze, M. B. Hossain, C. L. Barnes, J. Leong und D. v. d. Helm, *Biochemistry* **20**, 6446 (1981).
- [3] M. Teintze und J. Leong, *Biochemistry* **20**, 6457 (1981).
- [4] C. Yang und J. Leong, *Biochemistry* **23**, 3534 (1984).
- [5] G. Briskot, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **41c**, 497 (1986).
- [6] K. Poppe, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Tetrahedron* **43**, 2261 (1987).
- [7] G. Briskot, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 375.
- [8] P. Demange, S. Wendenbaum, A. Bateman, A. Dell, J. M. Meyer und M. A. Abdallah, in: *Iron, Siderophores, and Plant Diseases* (T. R. Swinburne, Hrsg.), NATO ASI Ser. A. Life Sciences, **Vol. 117**, S. 131, Plenum, New York 1986.
- [9] P. Demange, S. Wendenbaum, C. Linget, A. Bateman, J. MacLeod, A. Dell, A.-M. Albrecht und M. A. Abdallah, *Second Forum on Peptides* (A. Aubry, M. Marraud und B. Vitoux, Hrsg.), INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **174**, 95 (1989).
- [10] P. Demange, S. Wendenbaum, A. Bateman, A. Dell und M. A. Abdallah, in: *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals* (G. Winkelmann, D. v. d. Helm und J. B. Neilands, Hrsg.), S. 167, VCH, Weinheim 1987.
- [11] M. Persmark, T. Frejd und R. Mattiasson, *Biochemistry* **29**, 7398 (1990).
- [12] K. Geisen, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Monatsh. Chem.*, im Druck.
- [13] J. S. Buyer, J. M. Wright und J. Leong, *Biochemistry* **25**, 5492 (1986).
- [14] I. Berner, S. Konetschny-Rapp, G. Jung und G. Winkelmann, *Biol. Metals* **1**, 51 (1988).
- [15] A. Skorupska, M. Derylo und Z. Lorkiewicz, *Biol. Metals* **2**, 45 (1989).
- [16] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, S. 168, Thieme, Stuttgart 1976.
- [17] H. Weide und H. Aurich, *Allgemeine Mikrobiologie*, S. 247, Fischer, Stuttgart 1979.
- [18] J. X. de Vries, W. Günthert und R. Ding, *J. Chromatogr.* **221**, 161 (1980).
- [19] M. Schöneshöfer und A. Fenner, *J. Chromatogr.* **224**, 472 (1981).