

Cis-Hydroxylierung

Cyclohexanol aus Cyclohexen⁸⁵¹⁾

3,4 g (0,024 Mol) Bortrifluorid-ätherat werden zu einer Lösung von 4 g (0,049 Mol) Cyclohexen in 100 ml abs. Äther gegeben. Während 20 min läßt man hierauf eine Lösung von 0,7 g (0,018 Mol) LiAlH_4 in 70 ml Äther unter Einleiten von Stickstoff und äußerer Kühlung eintropfen. Die Reaktionslösung wird in einer Stickstoff-Atmosphäre 2 h weitergerührt. Vorsichtiger Zusatz von 20 ml Aceton dient zum Verbrauch überschüssigen Diborans. Zu der Lösung wird eine gesättigte Natriumsulfatlösung und festes Natriumsulfat zugegeben. Die ungelösten Bestandteile werden abfiltriert, der Niederschlag mit Äther nachgewaschen und das klare Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird in 30 ml 90-proz. Alkohol, in dem 0,8 g Natriumhydroxyd gelöst sind, aufgenommen und mit 20-proz. wässrigem Wasserstoffperoxyd innerhalb von 5 min versetzt, wobei sich die Lösung auf ca. 70 °C erwärmt. Bei dieser Temperatur wird noch weitere 5 min gehalten und dann abgekühlt. Man gibt Wasser und Äther zu, wäscht die Ätherschicht mit Wasser nach, trocknet und destilliert das Lösungsmittel ab. Die fraktionierte Destillation des Rückstands ergibt 4,0 g Cyclohexanol, Fp = 161 bis 162 °C (Ausb. 82 %).

Gleicherweise kann 1-Octen in einer Ausbeute von 80 % in n-Octanol, Fp = 194 bis 196 °C, übergeführt werden.

2-(p-Anisyl)-äthanol⁸⁶²⁾

Eine Lösung von 23,1 g (0,33 Mol) 2-Methyl-2-buten und 4,8 g (0,125 Mol) Natriumborhydrid in 80 ml Diglyme wird in Eis gekühlt, mit Stickstoff gespült und unter Rühren mit 23,6 g (0,166 Mol) Bortrifluoridätherat während 30 min versetzt. Nachdem das Reaktionsgemisch 1 h bei 0 °C gestanden hat, werden 20,1 g (0,15 Mol) p-Methoxystyrol während 5 min zugegeben. Nach ca. 2 h hat sich die Reaktionslösung auf Zimmertemperatur erwärmt; sie wird dann mit alkalischem Wasserstoffsuperoxyd oxydiert und mit Äther extrahiert. Die ätherischen Auszüge wäscht man viermal mit Wasser nach, wobei das Diglyme entfernt wird, trocknet und destilliert das Lösungsmittel ab. Das 2-(p-Anisyl)-äthanol erhält man in einer Ausbeute von 80 %, K_{p10} = 138 bis 140 °C, Fp = 27 bis 28 °C. Die gaschromatographische Analyse ergibt eine Reinheit von mindestens 98 %.

Herrn Direktor Dr. J. Renz danke ich für die anregenden Diskussionen und die Förderung dieser Arbeit.

Eingegangen am 25. August 1960 [A 101]

Aufklärung biologischer Syntheseketten an Mikroorganismen

Von Prof. Dr. H. HELLMANN und Doz. Dr. F. LINGENS

Chemisches Institut der Universität Tübingen

Zur Aufklärung biochemischer Syntheseketten bieten Mikroorganismen besonders günstige Voraussetzungen. Sie lassen sich rasch züchten, beanspruchen wenig Raum, sind in unzähligen Arten leicht zugänglich und können vielfach Synthesen vollführen, zu denen höher organisierte Lebewesen nicht imstande sind. Vor allem aber lassen sie sich mit einfachen Mitteln in Mutanten verwandeln, die auf verschiedene Weise eine leichte Analyse von Stoffwechselprodukten ermöglichen.

I. Biochemische Mangelmutanten

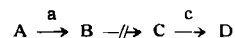
Mutanten entstehen durch eine Veränderung im genetischen Material, derzufolge ein Enzym, das eine bestimmte Reaktionsstufe innerhalb einer Synthesekette katalysiert, nicht mehr bereitgestellt wird. Eine „biochemische Mangelmutante“ kann daher im Gegensatz zum „Wildstamm“ eine spezielle Synthese nur bis zu einem Zwischenprodukt vollführen, von dem ab sie durch den Enzym-Mangel blockiert ist. Solche „auxotrophen Mutanten“ sind, um leben zu können, auf die Zufuhr eines Stoffes angewiesen, der in der Synthesekette hinter dem „Block“ liegt, sofern das Syntheseprodukt lebensnotwendig ist. Da meistens die Zufuhr eines einzigen Stoffes genügt, ist vermutlich infolge der Veränderung im Genbestand (Mutation) auch nur die Fähigkeit zur Bildung eines einzigen Enzyms verloren gegangen. G. W. Beadle hat auf Grund dieser Vermutung die These entwickelt, daß jedem Gen ein Enzym zuzuordnen sei, und zwar in der Weise, daß das Gen die Synthese des Enzyms steuert*).

Ist eine biochemische Synthesekette bis zu der durch Genmutation verursachten Unterbrechungsstelle unversehrt, so ergibt sich zwangsläufig eine Anhäufung des Zwischenproduktes, das unmittelbar vor dem Block liegt, da es ständig nachgeliefert, aber nicht mehr weiter verarbeitet wird. Diese Akkumulation kann einen so hohen Grad erreichen, daß man das bei einer intakten biochemischen Synthese normalerweise infolge seiner viel zu geringen Konzentration niemals nachweisbare, geschweige denn iso-

lierbare Zwischenprodukt in Substanz fassen und analysieren kann. Neuere Zusammenfassungen vgl. 1-12).

Zur Aufklärung von Stoffwechselprodukten an Mutanten bieten sich also die Möglichkeiten 1. vor den Unterbrechungsstellen akkumulierte Stoffe zu isolieren und zu identifizieren und 2. mutmaßliche Folgeprodukte auf ihre wachstumsfördernde Wirksamkeit zu prüfen.

Gesetzt den Fall, ein Stoff D werde aus A über die Zwischenstufen B und C mit Hilfe der Enzyme a, b und c synthetisiert und es versagt nun bei einer Mutante die Bereitstellung des Enzyms b, so kann B nicht mehr in C umgewandelt werden. Die Mutante ist daher auf die Zufuhr von D oder auch C angewiesen, um wachsen zu können. A und B dagegen unterstützen ihr Wachstum nicht.



Die Akkumulation von B läßt erkennen, daß die Unterbrechungsstelle hinter B liegen muß. Bestehen Anhaltspunkte für die Konstitution von C, so können Wachstumsversuche mit synthetischen Modellschubstanzen die Identifizierung von C ermöglichen.

1) G. W. Beadle, *Physiol. Rev.* 25, 643 [1945].

2) G. W. Beadle, *Fed. Proc.* 9, 512 [1950].

3) G. W. Beadle, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* 12, 466 [1955].

4) W. Braun: *Bacterial Genetics*, Saunders, Philadelphia u. London 1953.

5) B. D. Davis, *Fed. Proc.* 14, 691 [1955].

6) B. D. Davis, *Advances in Enzymol.* 16, 247 [1955].

7) P. Karlson, *Ergebn. Enzymforsch.* 13, 85 [1954].

8) W. D. McElroy u. B. Glass: *The Chemical Basis of Heredity*, Johns Hopkins Press, Baltimore 1957.

9) E. L. Oginsky u. W. W. Umbreit: *An Introduction to Bacterial Physiology*, Freeman, San Francisco 1955.

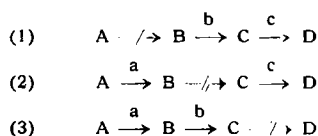
10) E. L. Tatum, *Fed. Proc.* 8, 511 [1949].

11) R. P. Wagner u. H. K. Mitchell: *Genetics and Metabolism*, Wiley, New York u. London 1955.

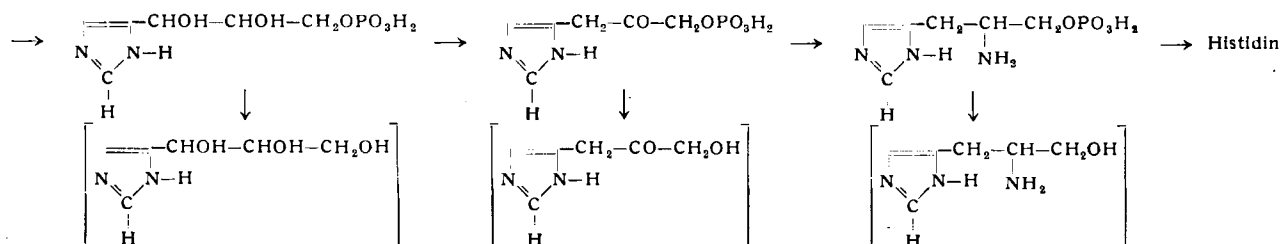
12) C. H. Werkmann u. P. W. Wilson: *Bacterial Physiology*, Academic Press, New York 1951.

* Man hat viel Mühe darauf verwandt, festzustellen, ob die für den blockierten Syntheseschritt verantwortlichen Enzyme bei den Mutanten vielleicht doch vorhanden, aber lediglich auf irgendeine Weise an der Entfaltung ihrer Aktivität gehindert werden. Man hat sie aber tatsächlich nicht finden können. Siehe z. B. C. Yanofsky, *J. biol. Chemistry* 224, 783 [1957]; C. Yanofsky in: *Enzymes, Units of biological Structure and Function*, Academic Press, New York 1956, S. 147; P. Lerner u. C. Yanofsky, *J. Bacteriol.* 74, 494 [1957].

Hat man drei Mutanten (1) bis (3) zur Verfügung, bei denen die Bildung von D blockiert ist, so läßt sich auch ohne Kenntnis der Vorprodukte A, B und C deren Reihenfolge

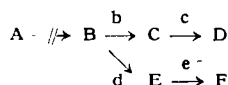


in der Synthesekette durch einen Kreuzfütterungsversuch¹³⁻¹⁵) („cross-feeding“, „syntrophism“) festlegen, denn die Mutante, die C akkumuliert und ausscheidet, ermöglicht den beiden anderen, (1) und (2) das Wachstum. Der B akkumulierende Organismus (2) kann nur der Mutante (1) zum Wachstum verhelfen, die wiederum die beiden

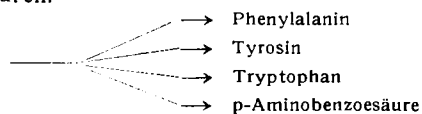


anderen nicht wachsen läßt. Der Test wird in der Weise durchgeführt, daß man an benachbarten Kultur-„Strichen“ der Organismen auf einem festen Agarnährboden prüft, welcher Stamm mit dem Akkumulat eines anderen ein kräftiges Wachstum zeigt*).

Neben diesen Mutanten, die nach Zugabe eines einzigen Stoffes (aus der Synthesekette hinter dem Block) wachsen können¹⁶), gibt es biochemische Mangelmутanten, die mehrere Stoffe zum Wachstum brauchen. Dies sind keine Mehrfachmutanten, die bei der Mutantenerzeugung nur sehr selten auftreten**), sondern „polyauxotrophe“ Mutanten, bei denen eine Unterbrechungsstelle in einer verzweigten Synthesekette vor der Verzweigung liegt, so daß sie auf die Zufuhr aller Verzweigungsendprodukte angewiesen sind,



nämlich sowohl von D oder C, als auch von F oder E. Die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und p-Aminobenzoesäure gehen aus einer Kette gemeinsamer Vorstufen, der „Aromatenbiosynthese“, hervor¹⁷). Mutanten mit einem genetischen Block in dieser Vorstufen-Synthesekette verlangen die gleichzeitige Zufuhr aller vier Aminosäuren.



¹³) B. D. Davis, *Experientia* 6, 41 [1950].

¹⁴) B. D. Davis u. E. S. Mingioli, *J. Bacteriol.* 60, 17 [1950].

¹⁵) F. Gibson u. M. J. Jones, *Australian J. Sci.* 17, 33 [1954].

¹⁶) E. A. Adelberg, *Bacteriol. Rev.* 17, 253 [1955].

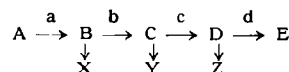
¹⁷) B. D. Davis in W. D. McElroy u. B. Glass: *Amino Acid Metabolism*. Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 797.

*) Auch durch genetische Analyse kann man die Reihenfolge der Blockierungen bei Mutanten ermitteln (siehe z.B. 4)). Durch Phagentransduktion ließ sich zeigen, daß sogar Mutanten, bei denen der gleiche Syntheseschritt blockiert ist, untereinander verschieden sein können. Man hat auf diese Weise Serien genetisch verschiedener Mangelmутanten jeweils einem biochemischen Syntheseschritt zugeordnet. Eine Deutung dieses sogenannten Pseudoallelproblems liegt noch nicht vor.

**) Zwischen einer Doppelmutante und einer Einfachmutante mit gleichzeitigem Bedarf mehrerer Stoffe kann unterschieden werden, wenn man ihr Verhalten bei der Reversion zum Ausgangswildstamm beobachtet. Beim normalen Züchten revertiert unter 10^7 – 10^8 Bakterien nur eine Zelle. Aus einer echten Doppelmutante können bei der Reversion neben der Wildform zwei Arten von Einfachmutanten entstehen, während die Einfachmutante in einem Schritt nur die Wildform bildet.

Bei der Analyse biochemischer Synthesen in Mikroorganismen muß man mit Komplikationen rechnen, die zu Fehlschlüssen Anlaß geben können:

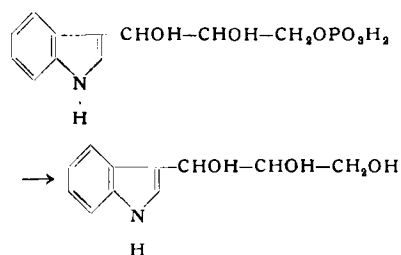
Wenn Akkumulate bei Fütterungsversuchen an geeigneten Mutanten kein Wachstum bewirken, so kann das daran liegen, daß die Akkumulate nicht mehr die echten biologischen Zwischenstufen (B, C und D) sondern Sekundärprodukte (X, Y und Z) darstellen, die unter den Versuchsbe-



dingungen nicht wieder in die Ausgangsstoffe umgewandelt werden. Ein Beispiel zeigt folgender Ausschnitt aus der Biosynthese von Histidin^{18, 19}) und Tryptophan²⁰):

Aus Imidazolylglycerin-phosphorsäureester entsteht durch Wasserabspaltung Imidazolyacetol-phosphorsäureester, der bei der Transaminierung Histidinol-phosphorsäureester liefert. Alle drei Stoffe konnten aus dem Mycel von *Neurospora crassa*-Mutanten isoliert werden. In den Kulturmedien wurden sie aber nur in entphosphorylierter Form gefunden. Die Phosphorsäureester können anscheinend die Zellmembran nicht passieren. Die entphosphorylierten Verbindungen werden zwar wieder aufgenommen, da sie aber nicht rephosphoryliert werden, bewirken sie kein Wachstum.

Die Biosynthese des Tryptophans verläuft über den Phosphorsäureester des Indolyl-3-glycerins. Im Medium entsprechend blockierter Mutanten von *Escherichia coli* und



Salmonella typhimurium fand man Indolyl-3-glycerin²⁰), das für die Mutanten nicht verwertbar ist, weil es nicht rephosphoryliert wird. Vor Aufklärung der Bildung und Umwandlung des Indolyl-3-glycerin-1-phosphorsäureesters hat man das Akkumulat irrtümlich für das Produkt eines Nebenweges der Synthesekette gehalten²¹). Keinesfalls darf also jedes Akkumulat kritisch als echtes Zwischenprodukt einer Biosynthesekette angesprochen werden.

Auch die Bildung von Kunstprodukten bei Wachstumsversuchen kann die Ursache von Fehlschlüssen sein, wie die beiden folgenden Beispiele zeigen:

Bei der Synthese des Tryptophans treten Anthranilsäure und Indol als Zwischenprodukte auf. Züchtet man Anthra-

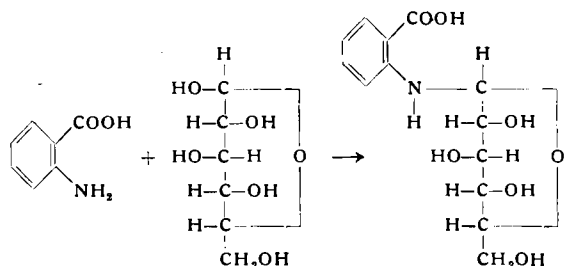
¹⁸) B. N. Ames, H. K. Mitchell u. M. B. Mitchell, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 1015 [1953].

¹⁹) B. N. Ames u. H. K. Mitchell, *J. biol. Chemistry* 212, 687 [1955].

²⁰) F. Lingens, H. J. Burkhardt, H. Hellmann u. F. Kaudewitz, *Z. Naturforsch.* 12b, 493 [1957].

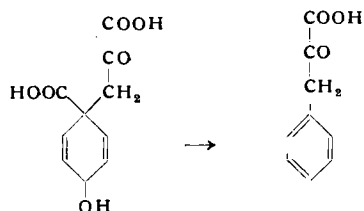
²¹) Nach B. D. Davis (*Arch. Biochem. Biophysics* 78, 497 [1958]) steht ein Akkumulat, das nicht mindestens eine ionisierte Gruppierung bei physiologischem p_H besitzt, im Verdacht, ein Kunstprodukt zu sein, da die Stoffe in ionisierter Form der Zelle offenbar leichter erhalten bleiben.

nilsäure akkumulierende Mutanten von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* in einem einfachen Salzmedium unter Zusatz von Glucose als Kohlenstoffquelle, so läßt sich aus dem Medium Glucosyl-anthranilsäure isolieren, die geeigneten Mutanten zum Wachstum verhelfen kann:



Sie entsteht aber spontan aus Anthranilsäure und Glucose des Mediums, ist also ein Kunstprodukt. Mit Glycerin oder Citrat als Kohlenstoffquelle wird nur Anthranilsäure gefunden²²⁾.

In dem zum Phenylalanin führenden Teil der Synthesekette, in dem die Aromatisierung stattfindet, tritt Prephen-säure auf, die man aus dem Medium von *Escherichia coli* und *Neurospora crassa*-Mutanten als Bariumsalz isoliert hat^{23,24)}. Diese Säure geht schon bei $p_H \leq 6$ spontan in Phenylbrenztraubensäure über, die zwar ein echtes Zwischenprodukt in der Phenylalanin-Synthese darstellt, deren



Bildung aber bei den erwähnten Mutanten genetisch blockiert ist. Die Mutanten können mit der auf diese Weise entstandenen Phenylbrenztraubensäure wachsen und überwinden dergestalt den genetischen Block. Hier tritt also ein labiles Zwischenprodukt auf, das sich spontan in ein für das Wachstum verwertbares „Kunstprodukt“ umwandelt, eine Erscheinung, welche die Aufklärung der Phenylalanin-Biosynthese erheblich erschwerte.

II. Erzeugung und Isolierung von Mutanten

Biochemische Mangelmutanten bilden sich in einer Bakterienpopulation in geringem Umfang spontan. Die Zahl der auxotrophen Mutanten, exakter formuliert die Mutationsrate, läßt sich aber durch die Einwirkung von Strahlen (Röntgen- und UV-Strahlen²⁵⁻²⁸⁾, Wärme²⁹⁾, durch Zerfall von eingebautem ³²P³⁰⁾ oder chemischen Agentien erheblich vergrößern. Als mutagene Stoffe kommen vor allem Senfgas, Stickstoff-Lost, Diazomethan, Äthylenoxyd, Formaldehyd und Nitrit³¹⁻³⁴⁾ in Betracht.

²⁵⁾ F. Lingens, H. Hellmann u. M. Hildinger, Z. Naturforsch., 13b, 727 [1958].

²⁶⁾ U. Weiss, C. Gilvarg, E. S. Mingioli u. B. D. Davis, Science [Washington] 119, 774 [1954].

²⁷⁾ R. L. Metzger u. H. K. Mitchell, Arch. Biochem. Biophys. 64, 51 [1956].

²⁸⁾ B. D. Davis, Experientia 6, 41 [1950].

²⁹⁾ J. Lederberg, Heredity 2, 145 [1948].

³⁰⁾ J. Lederberg u. E. M. Lederberg, J. Bacteriol. 63, 399 [1952].

³¹⁾ D. Rapport u. A. Canzanelli, Science [Washington] 112, 469 [1950].

³²⁾ S. Zamenhof u. S. Greer, Nature [London] 182, 611 [1958].

³³⁾ F. Kaudewitz, W. Vielmetter u. H. Friedrich-Freksa, Z. Naturforsch. 13b, 793 [1958].

³⁴⁾ C. Auerbach, Hereditas 37, 1 [1951].

³⁵⁾ E. L. Tatum, R. W. Barrat, N. Fries u. D. M. Bonner, Amer. J. Botany 37, 38 [1950].

³⁶⁾ F. Kaudewitz, Nature [London] 183, 1829 [1959].

³⁷⁾ F. Kaudewitz, Z. Naturforsch. 14b, 528 [1959].

Zur Abtrennung der gewonnenen Mutanten von der Ausgangs-Wildform bedient man sich bei Bakterien vornehmlich der eleganten Penicillin-Anreicherungs-methode von Lederberg und Davis^{35,36)}, welche sich die Tatsache zunutze macht, daß Penicillin nur in Vermehrung begriffene Bakterien tötet. Die Wildstämme der üblicherweise verwendeten Enterobacteriaceen lassen sich in einem einfachen Medium züchten, das anorganische Salze und eine Kohlenstoffquelle (meist Glucose) enthält. Die auxotrophen Mutanten können im Gegensatz zur Ausgangswildform auf einem solchen Minimalmedium nicht mehr wachsen, da sie zusätzlich das End- oder ein Zwischenprodukt einer bei ihnen unterbrochenen Synthesekette zum Wachstum benötigen. Durch Zusatz von Penicillin zum Minimalmedium kann somit eine Vernichtung der Wildform und eine Selektion der Mutanten erzielt werden.

Die Wirkung des Penicillins scheint darauf zu beruhen, daß es den Einbau eines wichtigen Bausteins (eines Peptids aus Alanin, Glutaminsäure, Lysin und „Muraminsäure“ (3-O-D-Lactyl-D-glucosamin³⁷⁾), in die Zellwand verhindert³⁸⁾. Nach Zusatz von Penicillin ist bei Bakterien die Akkumulation eines Uridin-5-pyrophosphat-Komplexes dieses Peptids beobachtet worden³⁹⁾. Weidel und Primosigh⁴⁰⁾ zeigten, daß die Lyse der Bakterien durch Penicillin oder durch Phagen nach einem gleichartigen Mechanismus verläuft.

Bei der Einwirkung des Penicillins muß dafür gesorgt werden, daß kein Mutantenwachstum durch Syntrophismus (vgl. S. 108) eintritt, da dieses den Verlust der Mutanten zur Folge hätte. Z. B. läßt sich das Wachstum von Thiamin-Mangelmutanten bei der Penicillin-Selektion durch Zugabe von kompetitiven Hemmstoffen für Thiazol und Pyrimidin verhindern⁴¹⁾.

Alle Methoden der Mutantenerzeugung liefern Gemische verschiedener Mutanten. Die zahlenmäßige Verteilung ist von der Methode abhängig, z. B. entstehen bei Einwirkung von ³²P wenig Glycin-Serin-Mangelmutanten, die bei UV-Bestrahlung und auch spontan zahlreich auftreten³⁰⁾. Zur raschen Austestung der Mutanten sind mehrere Verfahren entwickelt worden, die prinzipiell auf der Beobachtung des Wachstums nach Zusatz von Aminosäuren, Vitaminen, Purinen, Pyrimidinen usw. beruhen^{30,42)}.

Die Anwendung des Penicillins zur Selektion ist auf Bakterien beschränkt. Beim klassischen Objekt der biochemischen Genetik, dem Brotschimmelpilz *Neurospora crassa*, sind Mutanten durch Einwirkung von UV-, Röntgenstrahlen und chemischen Stoffen erzeugt worden. Hier war eine genetische Analyse durch systematische Kreuzungsversuche möglich¹⁾. Auch von anderen Mikroorganismen z. B. *Saccharomyces cerevisiae* sind Mutanten durch UV-Strahlen hergestellt worden⁴³⁾.

Eine gezielte Selektion ganz bestimmter Mutanten ist mit dem Schichtagar-Verfahren von Cohen, Lichtenstein, Barner und Green⁴⁴⁾ möglich. Hierbei wird der Wildstamm zunächst mit UV-Licht bestrahlt, so daß 99,9% der Zellen getötet werden. Anschließend bringt man die Mikroorganismen in eine Petrischale mit einem Agar-Minimalmedium, in dem nur die Wildform wachsen kann. Nach 2-tägiger Bebrütung bezeichnet man die gebildeten Wildtypkolonien und bringt eine weitere Agarschicht auf, die

³⁵⁾ J. Lederberg u. N. Zinder, J. Amer. chem. Soc. 70, 4267 [1948].

³⁶⁾ B. D. Davis, J. Amer. chem. Soc. 70, 4267 [1948].

³⁷⁾ F. Zilliken, Angew. Chem. 71, 654 [1959].

³⁸⁾ J. T. Park u. J. L. Strominger, Science [Washington] 125, 99 [1957].

³⁹⁾ J. T. Park u. M. J. Johnson, J. biol. Chemistry 179, 585 [1949].

⁴⁰⁾ W. Weidel u. J. Primosigh, Z. Naturforsch. 12b, 419 [1957].

⁴¹⁾ H. Nakayama, Vitamins [Kyoto] 11, 20 [1956].

⁴²⁾ R. Holiday, Nature [London] 178, 987 [1956].

⁴³⁾ R. K. Mortimer, R. S. Lerner u. J. K. Barr, US. Atomic Energy Comm. UCRL 3746 [1957].

⁴⁴⁾ S. S. Cohen, J. Lichtenstein, H. D. Barner u. M. Green, J. biol. Chemistry 228, 613 [1957].

Minimalmedium und den Stoff enthält, dessen Mangelmangel isoliert werden sollen. Bei der weiteren Bebrütung wachsen dann nur die gewünschten Mutanten und die markierten Kolonien der Ausgangsform, die man leicht unterscheiden kann.

III. Optimale Akkumulation von Stoffwechselzwischenprodukten

Akkumulate ermöglichen die Aufklärung von Biosynthesen. Die angehäuften Mengen sind jedoch oft so gering, daß die präparative Aufarbeitung Schwierigkeiten macht. Es empfiehlt sich daher, die Bedingungen für die Erzielung einer maximalen Akkumulation zu ermitteln⁴⁵⁾.

Versuche hierzu wurden durchgeführt an Tryptophan-Mangelmutanten von *Salmonella typhimurium*, die Indol ansammeln, deren genetischer Block also in der Tryptophan-Synthesekette unmittelbar vor dem Endprodukt liegt. Aus der Abhängigkeit des Wachstums von der zugesetzten Menge an DL-Tryptophan geht hervor, daß die Konzentration für optimales Wachstum bei 8 γ DL-Tryptophan/ml Medium liegt. Mit größeren Tryptophangaben tritt keine Zunahme des Bakterientiters ein. Im Medium findet sich unter diesen Bedingungen überschüssiges Tryptophan, aber kein Indol. Dagegen ließ sich Indol beim Züchten mit suboptimalen Tryptophan-Konzentrationen einwandfrei nachweisen. Für die Erzeugung einer bestimmten Keimzahl braucht man doppelt soviel DL- wie L-Tryptophan. Die an das Medium abgegebenen Indolmengen verhalten sich aber bei Zugabe von L- bzw. DL-Tryptophan wie 2,5:1. Demnach ruft D-Tryptophan eine Hemmung der Indolbildung hervor, ermöglicht aber den Tryptophan-Mangelmutanten kein Wachstum. Überschüssiges Tryptophan jeglicher Konfiguration hemmt die Tryptophan-Biosynthese⁴⁶⁻⁴⁸⁾. Um optimale Mengen des Akkumulationsproduktes zu erhalten, werden die Mutanten nur mit L-Tryptophan gezüchtet, und zwar mit 0,5 bis 1 γ /ml Medium. Je nach Mutante gewinnt man auf diese Weise etwa 1–10 mg Indol/l.

Der hemmende Einfluß eines Endproduktes auf seine Biosynthese, der als negative Rückkopplung („negative feedback“) bezeichnet wird, ist auch an anderen Objekten beobachtet worden und dürfte eine allgemeine Erscheinung sein. Man kann diesen Effekt auf zweierlei Weise erklären: Entweder hemmt das Endprodukt die Aktivität eines Enzyms oder mehrerer Enzyme seiner Synthesekette (a), oder das Endprodukt unterdrückt die Synthese eines Enzyms (b). Für beide Vorstellungen gibt es Beispiele.

a) *Adelberg* und *Umbarger* beobachteten eine Abnahme der Akkumulation von α -Keto-isovaleriansäure in Gegenwart größerer Mengen Valin⁴⁹⁾. Nach *Umbarger* und *Brown* hemmt L-Isoleucin vollständig die Wirkung der L-Threonin-Desaminase, eines Enzyms, das zur Umwandlung von L-Threonin zu L-Isoleucin benötigt wird⁵⁰⁾. Eine Regulierung der Threonin-Biosynthese in *E. coli* wird von *Wormser* und *Pardee* beschrieben⁵¹⁾. Eine Rückkopplungshemmung im Purin-Stoffwechsel bei Bakterien gibt *Gots* an⁵²⁾: eine Purin-Mangelmutante akkumuliert das Ribosid des 5-Amino-4-imidazolcarboxamids mit einem Überschuß an Purinen nicht mehr. Bei Pyrimidin-Mangelmutanten von *Aerobacter aerogenes* konnte die Akkumulation von Orotsäure durch Uracil unterdrückt werden. Uracil verhindert dabei nicht die Bildung des Enzyms, sondern hemmt nur dessen Aktivität⁵³⁾. *Yates* und *Par-*

*dee*⁵⁴⁾ zeigten, daß die Bildung von Uridobernsteinsäure durch Uridintriphosphat gehemmt wird. Nach *Wyngaarden* und *Ashton*⁵⁵⁾ wird die Aktivität der Phosphoribosyl-pyrophosphat-Amidotransferase durch Purin-ribonucleotide reguliert. *Strecker*⁵⁶⁾ zeigte, daß die Umwandlung von Glutaminsäure in Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure durch Zugabe von Prolin gehemmt wird.

b) Nach *Gorini* und *Maas*^{56a)} wird durch Arginin die Synthese der Ornithin-Transcarbamylase unterdrückt. Untersuchungen von *Vogel*^{56b)} beschäftigten sich mit der negativen Rückkopplungskontrolle bei der Bildung der Acetyl-ornithinase.

IV. Akkumulatbildung durch Hemmstoffe

Hemmstoffe liefern bei der Wirkung auf Mikroorganismen unter günstigen Bedingungen Akkumulate, sofern sie den Stoffwechsel durch Unterbrechung einer oder mehrerer Biosyntheseketten stören. Wie erwähnt, kann in Bakterienkulturen durch Zusatz von Penicillin ein Zellwandbaustein akkumuliert werden³⁹⁾. *Škoda* und *Šorm*⁵⁷⁾ beobachteten bei Zugabe von 6-Aza-uracil zu einer Kultur von *E. coli* die Ausscheidung von Orotsäure sowie von Uracil, Hypoxanthin und 6-Aza-uracil-ribosid. Nach *Harrington*⁵⁸⁾ wird durch wachstumshemmende Chloramphenicol-Mengen die Proteinsynthese gehemmt und die Nucleinsäuresynthese beeinflusst, so daß im Medium freie Purin- und Pyrimidin-Basen auftreten, u.a. Guanin, Hypoxanthin und Uracil. Darüber hinaus wurden auch Valin, Leucin und Methionin nachgewiesen, die allerdings auch ohne Zusatz von Chloramphenicol auftreten, wie *Harrington* und *Dunlop*⁵⁹⁾ in einer Untersuchung über die Synthese von Aminosäuren durch *E. coli*-Wildstamm in reinen Kulturen zeigten. Dieses Beispiel zeigt einmal mehr, daß man nicht jede in Kulturmedien gefundene Substanz als ein durch Mutation oder Hemmung bedingtes Akkumulat ansprechen darf. *Webb*⁶⁰⁾ wies nach, daß der Folsäure-Antagonist Aminopterin (4-Amino-4-desoxypteroyl-glutaminsäure) während der Hemmung die Ausscheidung von 5-Amino-4-imidazolcarboxamid-ribosid, Alanin und Valin veranlaßt. Nach *Gots*⁶¹⁾ akkumulieren mit Sulfonamid gehemmte Bakterien 5-Amino-4-imidazolcarboxamid.

V. Wirkung von Hemmstoffen

Ein Hemmstoff kann wie ein „äußerer Block“ wirken. Man könnte diese Erscheinung als „chemische Blockierung“ bezeichnen. In vielen Fällen ist aber bei der Hemmung keine Akkumulatbildung nachgewiesen worden. Aus diesem Grunde läßt sich oft auch keine Entscheidung darüber treffen, wo und wie der Hemmstoff eingreift. Durch zusätzliche Gabe des Endproduktes der vermutlich gestörten Synthesekette kann man die Hemmung oft kompetitiv aufheben. Auf diese Weise ist die Wirkung von chemotherapeutisch verwendeten Hemmstoffen und von Antibiotica aufgeklärt worden. Häufig genügen geringfügige Änderungen an einem Molekül, um z.B. aus einem Wirkstoff einen Antiwirkstoff (Vitamin–Antivitamin) werden zu lassen. Der Organismus besitzt kein scharfes Unterscheidungsvermögen für beide und baut daher bei entsprechendem Angebot den für ihn fehlerhaften Stoff ein, der dann aber nicht die gewünschten Dienste leistet. Der

⁴⁵⁾ F. Lingens, H. J. Burkhardt, H. Hellmann u. F. Kaudewitz, Z. Naturforsch. 12b, 497 [1957].

⁴⁶⁾ P. A. Trudinger, Biochem. J. 62, 480 [1956].

⁴⁷⁾ L. D. Wright u. H. R. Skeggs, J. biol. Chemistry 159, 611 [1945].

⁴⁸⁾ A. Novick u. L. Szillard: Dynamics of Growth Processes. Princeton University Press, 1954, S. 21.

⁴⁹⁾ E. A. Adelberg u. H. E. Umbarger, J. biol. Chemistry 205, 475 [1953].

⁵⁰⁾ H. E. Umbarger u. B. Brown, J. biol. Chemistry 233, 415 [1958].

⁵¹⁾ E. H. Wormser u. A. B. Pardee, Arch. Biochem. Biophysics 78, 416 [1958].

⁵²⁾ J. S. Gots, J. biol. Chemistry 228, 57 [1957].

⁵³⁾ M. S. Brooke, D. Ushiba u. B. Magasanik, J. Bacteriol. 68, 534 [1954].

⁵⁴⁾ R. A. Yates u. A. B. Pardee, J. biol. Chemistry 221, 757 [1956].

⁵⁵⁾ J. B. Wyngaarden u. D. M. Ashton, Nature [London] 183, 747 [1959]; J. biol. Chemistry 234, 1492 [1959].

⁵⁶⁾ H. S. Strecker, J. biol. Chemistry 225, 825 [1957].

^{56a)} W. K. Maas u. L. Gorini, Physiol. Adapt. Sympos. Woods Hole, Maas, 1957, S. 151; L. Gorini u. W. K. Maas, Biochim. biophysica Acta 25, 208 [1957].

^{56b)} H. J. Vogel in W. D. McElroy u. B. Glass: The Chemical Basis of Heredity, Johns Hopkins Press, Baltimore 1957, S. 276.

⁵⁷⁾ J. Škoda u. F. Šorm, Biochim. biophysica Acta 28, 659 [1958].

⁵⁸⁾ M. G. Harrington, J. gen. Microbiol. 18, 767 [1958].

⁵⁹⁾ M. G. Harrington u. S. G. Dunlop, J. Bacteriol. 58, 457 [1949].

⁶⁰⁾ M. Webb, Biochemic. J. 70, 472 [1958].

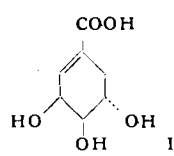
⁶¹⁾ J. S. Gots, Fed. Proc. 9, 178 [1950].

Nachweis für den Einbau ließ sich durch radioaktive Markierung erbringen. Außer Vitaminen sind auch andere Stoffe (Aminosäuren, Pyrimidine) abgewandelt worden (Aza-tryptophan, 6-Bromuracil).

Die Ergebnisse auf diesem Gebiet sind so vielgestaltig, daß sie im Rahmen dieses Aufsatzes nicht erschöpfend dargestellt werden können. In der Zeitschrift „Antibiotics and Chemotherapy“ z. B. erscheinen laufend Arbeiten über dieses Thema. Hier einige Beispiele: Wacker, Kolm und Ebert⁶²⁾ untersuchten die Hemmung von *Enterococcus Stei* durch p-Aminosalicylsäure und Salicylsäure, die sich durch p-Aminobenzoesäure, 5-Formyl-5.6.7.8-tetrahydropteroylglutaminsäure und Thymin aufheben ließ. Sie geben eine Erklärung der p-Aminosalicylsäure-Resistenz. Der Einbau von 5-Bromuracil-(2-¹⁴C) in die Desoxyribonucleinsäure verschiedener Bakterien wurde untersucht⁶³⁾. Zum Studium des Sulfanilamid-Stoffwechsels bei empfindlichen und resistenten Bakterien kam Sulfanilamid-(³⁵S) zur Anwendung⁶⁴⁾. Die Hemmung von *E. coli* durch Penicillin wird durch Isoleucin, Valin oder Leucin aufgehoben⁶⁵⁾. Brock und Brock⁶⁶⁾ verglichen die Wirkung von Chloramphenicol und Erythromycin auf die Nucleinsäuresynthese. Ciak und Hahn⁶⁷⁾ untersuchten die additive Wirkung von Chloramphenicol und Tetracyclinen auf das Wachstum von *E. coli*. Dieselben Autoren beschäftigten sich mit der Wirkung des Cycloserins⁶⁸⁾. Verschiedene Antivitamine des Pyridoxalphosphats wurden in ihrer Wirkung auf *Saccharomyces carlsbergensis*⁶⁹⁾ und auf andere Mikroorganismen verglichen⁷⁰⁾.

VI. Wachstumsteste mit synthetischen Modellschubstanzen

Wie eingangs erwähnt, können synthetische Substanzen im Wachstumstest an Mutanten zur Aufklärung einer Synthesekette herangezogen werden, wenn Anhaltspunkte für die chemische Konstitution des natürlichen Zwischenproduktes gegeben sind. Beispielsweise fand Davis⁷¹⁾ an polyauxotrophen Mutanten der Aromaten-Biosynthese, die nur bei gleichzeitiger Gabe von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, p-Aminobenzoesäure und p-Hydroxybenzoesäure wachsen, unter 55 getesteten Modellschubstanzen eine einzige, die im Wachstumstest das Gemisch der erwähnten Verbindungen ersetzen konnte, nämlich die Shikimisäure (I).



Diese Säure wurde zwei Jahre später tatsächlich als Akkumulat in den Kulturmedien von *Enterobacteriaceae*- und *Bacillus subtilis*-Mutanten nachgewiesen⁷²⁾. Sie stellt eine wichtige Schlüsselsubstanz in der Aufklärung der Aromaten-Biosynthese dar. Auch bei *Neurospora crassa* ist sie Vorstufe der aromatischen Aminosäuren⁷³⁾. Kürzlich gelang ihre Isolierung aus dem Medium einer *Saccharomyces cerevisiae*-Mutante⁷⁴⁾.

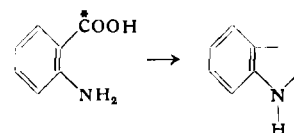
VII. Verwendung isotonen-markierter Modellschubstanzen

Die Methoden zur Untersuchung biochemischer Syntheseketten lassen sich vorteilhaft durch die Verwendung radioaktiv markierter Verbindungen ergänzen. In vielen Fällen wurde der erste Anhaltspunkt für die Vorstellung von den Umwandlungen in einer Synthesekette auf diese Weise gewonnen.

- ⁶²⁾ A. Wacker, H. Kolm u. M. Ebert, Z. Naturforsch. 13b, 147 [1958].
⁶³⁾ A. Wacker, A. Trebst, D. Jacherts u. F. Weygand, Z. Naturforsch. 9b, 616 [1954].
⁶⁴⁾ A. Wacker, A. Trebst u. H. Simon, Z. Naturforsch. 12b, 315 [1957].
⁶⁵⁾ R. M. Blair u. H. V. Aposhian, Biochim. biophysica Acta 30, 214 [1958].
⁶⁶⁾ T. D. Brock u. M. L. Brock, ebenda 33, 274 [1959].
⁶⁷⁾ J. Ciak u. F. E. Hahn, J. Bacteriol. 75, 125 [1958].
⁶⁸⁾ J. Ciak u. F. E. Hahn, Antibiotics Chemotherapy 9, 47 [1959].
⁶⁹⁾ T. Sakuragi u. F. A. Kummerow, Arch. Biochem. Biophysics 82, 89 [1959].
⁷⁰⁾ J. C. Rabinowitz u. E. E. Snell, ebenda 43, 408 [1953].
⁷¹⁾ B. D. Davis, J. biol. Chemistry 191, 315 [1951].
⁷²⁾ B. D. Davis u. E. S. Mingioli, J. Bacteriol. 66, 129 [1953].
⁷³⁾ E. L. Tatum, S. R. Gross, G. Ehrensward u. L. Garnjobst, Proc. nat. Acad. Sci. USA 40, 271 [1954].
⁷⁴⁾ F. Lingens u. H. Hellmann, Z. Naturforsch. 13b, 462 [1958].

Die Synthese isotonenhaltiger Verbindungen wurde von Weygand und Simon^{75, 76)} ausführlich beschrieben. Über die Anwendung von Isotonen in der Biochemie unterrichten neuere Zusammenfassungen von Broda⁷⁷⁾ und Aronoff⁷⁸⁾.

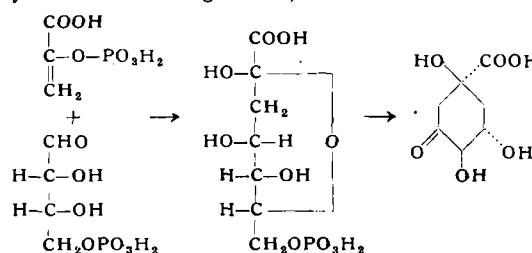
Bei der Tryptophan-Biosynthese wurde beispielsweise mit Hilfe von Carboxyl-¹⁴C-markierter Anthranilsäure an *N. crassa* gezeigt⁷⁹⁾, daß der markierte Kohlenstoff als Kohlendioxyd abgespalten wird. Versuche mit ¹⁵N-markierter Anthranilsäure führten zum Nachweis der Beteiligung des Stickstoffs der Anthranilsäure an der Bildung des Indolrings⁸⁰⁾.



Mit Ribose und Glucose, die an den C-Atomen 1 und 2 markiert waren, konnte Yanofsky⁸¹⁾ zeigen, daß die beiden ersten C-Atome der Zucker die C-Atome 2 und 3 des Indolrings bilden.

VIII. Gewinnung von Rohextrakten und reinen Enzymen

Die Frage, ob ein Akkumulat als echtes Zwischenprodukt einer Synthesekette anzusprechen ist, kann häufig durch Versuche mit einem Extrakt, noch besser mit einem reinen Enzym entschieden werden. Das echte Zwischenprodukt ist dadurch ausgezeichnet, daß es sich durch ein einziges Enzym in das unmittelbar folgende Produkt umwandeln läßt. Eine synthetische Modellschubsubstanz kann ebenfalls in einen Enzymversuch eingesetzt werden. Aber auch hier ist eine kritische Beurteilung des Ergebnisses am Platze, denn die eingesetzte Verbindung kann im Enzymgemisch erst in das echte Zwischenprodukt umgewandelt werden und so eine Wirkung vortäuschen. Als Vorprodukt der Aromaten-Biosynthese ist beispielsweise Sedoheptulose-1.7-diphosphat postuliert worden⁸²⁾. Spätere Untersuchungen haben gezeigt, daß durch Kondensation von D-Erythrose-4-phosphat und Phosphoenol-brenztraubensäure zunächst 2-Keto-3-desoxy-D-araboheptonsäure-7-phosphorsäure gebildet wird, die durch anschließende Cyclisierung als Zwischenprodukt der Aromaten-Biosynthese 5-Dehydrochinasäure ergibt^{83, 84)}.



- ⁷⁵⁾ F. Weygand u. H. Simon in Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie (herausgeg. v. Eugen Müller). Georg Thieme, Stuttgart 1955, Bd. 4/2, S. 539.
⁷⁶⁾ F. Weygand, Angew. Chem. 61, 285 [1949].
⁷⁷⁾ E. Broda: Radioaktive Isotope in der Biochemie. Deuticke, Wien 1958.
⁷⁸⁾ S. Aronoff: Techniques of Radiobiology. Iowa State College Press, Ames, Iowa, 1957.
⁷⁹⁾ J. F. Nyc, H. K. Mitchell, E. Leifer u. W. H. Langham, J. biol. Chemistry 179, 783 [1949].
⁸⁰⁾ C. W. H. Partridge, D. M. Bonner u. C. Yanofsky, J. biol. Chemistry 194, 269 [1954].
⁸¹⁾ C. Yanofsky, ebenda 217, 345 [1955].
⁸²⁾ E. B. Kalan, B. D. Davis, P. R. Srinivasan u. D. B. Sprinson, J. biol. Chemistry 223, 907 [1956]; 223, 913 [1956]; E. B. Kalan u. P. R. Srinivasan in W. D. McElroy u. B. Glass: Amino Acid Metabolism. Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 826.
⁸³⁾ P. R. Srinivasan, M. Katagiri u. D. B. Sprinson, J. biol. Chemistry 234, 713 [1959].
⁸⁴⁾ P. R. Srinivasan u. D. B. Sprinson, ebenda 234, 716 [1959].

Im allgemeinen Kohlenhydrat-Stoffwechsel kann Sedoheptulose-1,7-diphosphat D-Erythrose-4-phosphat und Phosphoenol-brenztraubensäure liefern.

Die bekannten Methoden der Enzymchemie^{85, 86)} sind auch auf Mikroorganismen anwendbar. Zur Gewinnung zellfreier Extrakte aus Mikroorganismen sind mehrere Verfahren entwickelt worden, die darauf abzielen, in möglichst großer Ausbeute auch labile Enzyme in Freiheit zu setzen. Jedoch führt nicht jede Methode bei allen Mikroorganismen zum Ziele. Einen Überblick über die chemischen und physikalischen Methoden zur Lyse gibt *Pethica*⁸⁷⁾. Zellfreie Extrakte von Bakterien werden vielfach durch Zerreiben mit Aluminiumpulver gewonnen⁸⁸⁻⁹⁰⁾. Aus *Neurospora crassa* läßt sich bequem durch Einfrieren und Zerstoßen des spröden Mycels unter Zusatz von Kohlensäureschnee ein Pulver gewinnen, dessen Enzyme durch Puffer extrahierbar sind⁹¹⁾. *Bolle*⁹²⁾ verglich die Wirksamkeit verschiedener oberflächenaktiver Stoffe zur Lyse von *E. coli*. Unter den oberflächenaktiven Stoffen hat sich nach Untersuchungen an *E. coli* und *S. typhimurium* besonders Saptanol (Firma Henkel, Düsseldorf) bewährt⁹³⁾. Die Schall-Lyse von Bakterien untersuchte *Rotman*⁹⁴⁾; sie tritt bei niedrigem p_H-Wert und bei geringer Ionenstärke nicht ein. Nach der Schallbehandlung kann die Lyse durch neutrale Puffer hervorgerufen werden. In jüngster Zeit wurden Vibrations-Homogenisatoren für den Aufschluß von Mikroorganismen entwickelt^{94, 95)}. Das Gerät nach *Zillig* und *Hölzel* homogenisiert die Mikroorganismen unter Kühlung durch Vibration mit Glasperlen (Ø 0,1 mm für Bakterien und 0,5 mm für Hefen) bei etwa 50 Hz.

IX. Mikrobialanalyse

Zur „Mikrobialanalyse“ werden als Testorganismen Wildformen von Bakterien, Hefen, Pilzen oder Protozoen, die u. a. auf die Zufuhr des zu testenden Stoffes angewiesen sind, herangezogen. Ein im allgemeinen vollsynthetisches Medium ermöglicht dem Testorganismus optimales Wachstum. Läßt man den zu bestimmenden Bestandteil aus dem Medium weg, so tritt keine Vermehrung ein. Setzt man diesen Stoff in suboptimalen Mengen zu, so beobachtet man ein der zugesetzten Menge proportionales Wachstum. Das Wachstum läßt sich nephelometrisch, aus dem Mycelgewicht oder aus der Keimungsrate der Conidien⁹⁶⁾ quantitativ bestimmen. Bei Lactobacillen kann auch die Titration der gebildeten Milchsäure zur Messung des Wachstums verwendet werden. Eine Meßreihe mit bekannten Dosen liefert eine Eichkurve, die zu jeder Meßreihe erneuert werden muß. Das beschriebene Verfahren ist zu einer Standardmethode entwickelt worden, die es gestattet, Vitamine und Aminosäuren in kleinsten Mengen quantitativ zu erfassen, mit deren Hilfe aber auch z. B. Metallionen, wie Eisen, Kupfer, Mangan und Molybdän⁹⁷⁾, bestimmt werden können⁹⁸⁻¹⁰⁵⁾.

⁸⁵⁾ O. Hoffmann-Ostenhof: Enzymologie. Springer, Wien 1954.

⁸⁶⁾ S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Academic Press, New York 1955-1958, Bd. I-IV.

⁸⁷⁾ B. A. Pethica, J. gen. Microbiol. 18, 473 [1958].

⁸⁸⁾ H. McIlwain, ebenda 2, 288 [1948].

⁸⁹⁾ L. A. Manson u. J. O. Lampen, J. biol. Chemistry 193, 539 [1951].

⁹⁰⁾ D. J. D. Nicholas u. A. Nason, J. Bacteriol. 69, 580 [1955].

⁹¹⁾ B. N. Ames, J. biol. Chemistry 228, 131 [1957].

⁹²⁾ A. Bolle, Pharm. Acta Helvetica 32, 1 [1957].

⁹³⁾ B. Rotman, J. Bacteriol. 72, 827 [1956].

⁹⁴⁾ W. Zillig u. H. Hölzel, Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 312, 140 [1958].

⁹⁵⁾ M. Merckenschlager, K. Schlossmann u. W. Kurz, Biochem. Z. 329, 332 [1957].

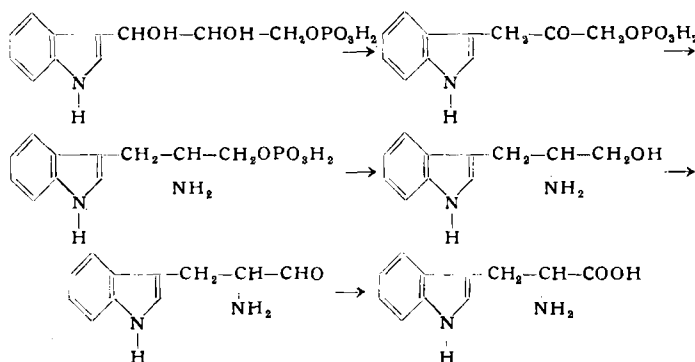
⁹⁶⁾ F. J. Ryan, Fed. Proc. 3, 366 [1946].

⁹⁷⁾ D. J. D. Nicholas, Analyst 77, 629 [1952].

⁹⁸⁾ D. Mücke: Einführung in mikrobiologische Bestimmungsverfahren (Quantitative Bestimmung von Aminosäuren und Vitaminen des B-Komplexes). Thieme, Leipzig 1955.

Wacker hat im „Vitamin T“ auf diese Weise ein Gemisch bekannter Vitamine festgestellt¹⁰⁶⁾. Die Futtersäfte der Bienenkönigin („Gelee royale“) und der Arbeiterinnen wurden quantitativ in ihrem Vitamingehalt verglichen¹⁰⁷⁾.

Die zur Testung verwendeten Mikroorganismen können als biochemische „Dauer-Mangelmutanten“ bezeichnet werden. Echte Mutanten sind dadurch ausgezeichnet, daß bei ihnen eine Reversion zur Ausgangswildform möglich ist. Diese Reversion ist ein seltenes, aber statistisch festgelegtes Ereignis. Bei den hier beschriebenen, auf die Zufuhr von Aminosäuren und Vitaminen u. a. angewiesenen Dauerformen ist keine Reversion zu einer unabhängigen Wildform bekannt. Sie sind vielfach zu einer Teilsynthese der für sie notwendigen Verbindungen befähigt. Daher können sie zur Testung mutmaßlicher Vorprodukte von z. B. Vitaminen oder Aminosäuren herangezogen werden. Als Testsubstanzen lassen sich synthetische Modellsubstanzen oder Akkumulate anderer Mutanten verwenden. Im komplexen Medium von *Lactobacillus arabinosus* kann z. B. Tryptophan durch Indol¹⁰⁸⁾ oder Anthranilsäure¹⁰⁹⁾ ersetzt werden. Mit Hilfe von *L. arabinosus* und anderen tryptophanabhängigen Organismen wurde die Frage geprüft, ob ein Tryptophan-Biosyntheseweg unter Erhaltung der im Indolyl-3-glycerin-1-phosphorsäureester vorgebildeten C₃-Seitenkette möglich ist. Tryptophanol-phosphorsäureester, Tryptophanol und Tryptophanal konnten Tryptophan bei *L. arabinosus* und *Streptococcus faecalis* nicht ersetzen¹¹⁰⁾.



Demnach scheidet hier der in Analogie zur Histidinsynthese^{18, 19)} postulierte Biosyntheseweg aus.

X. Kombination der Methoden

Aus dem vorhergehenden ist ersichtlich, daß im allgemeinen keine der angegebenen Methoden allein zur Aufklärung einer Biosynthesekette ausreicht. Daher werden die verschiedenen Verfahren miteinander kombiniert. Ein erster Anhaltspunkt kann z. B. durch die Konstitutionsaufklärung eines Akkumulates gewonnen werden. Die radioaktiv markierte Synthese eines Vorproduktes läßt im Enzymversuch erkennen, auf welchem Wege die Umwandlung vor sich geht. Ein mutmaßliches Folgeprodukt kann synthetisiert und an Mangelmutanten verfüttert werden. Die Glieder der Synthesekette lassen sich schließlich durch

⁹⁹⁾ O. Wiss, Chimia 4, 127 [1950].

¹⁰⁰⁾ O. Wiss, Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. 41, 245 [1950].

¹⁰¹⁾ E. E. Snell, Advances Protein Chem. 2, 85 [1945].

¹⁰²⁾ E. E. Snell, Physiol. Rev. 28, 255 [1948].

¹⁰³⁾ S. H. Hutner, A. Cury u. H. Baker, Analytic. Chem. 30, 849 [1958].

¹⁰⁴⁾ H. W. Loy u. W. W. Wright, ebenda 31, 971 [1959].

¹⁰⁵⁾ R. K. Finn, ebenda 31, 975 [1959].

¹⁰⁶⁾ A. Wacker, H. Dellweg u. E. Rowold, Klin. Wschr. 29, 780 [1951].

¹⁰⁷⁾ F. Lingens u. H. Rembold, Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 314, 141 [1959].

¹⁰⁸⁾ B. S. Schweigert, H. E. Saubertich, C. A. Baumann u. C. Elvehjem, Arch. Biochem. 10, 1 [1946].

¹⁰⁹⁾ E. E. Snell, Arch. Biochem. 2, 389 [1943].

¹¹⁰⁾ F. Lingens, H. J. Burkhardt u. H. Hellmann, Z. Naturforsch. 13b, 644 [1958].

Rohextrakte und durch die reinen Enzyme ineinander überführen. Ein schönes Beispiel für die Kombination der Methoden bieten die ausgezeichneten Untersuchungen zur Aufklärung der Aromaten-Biosynthese von Davis und Mitarbeitern¹¹¹⁾.

XI. Ausblick

Die chemische Mikrobiologie ist ein junger Zweig innerhalb der biochemischen Forschung. Sie erhielt ihre wesentlichen Impulse durch die Einführung des Brotschimmelpilzes *Neurospora crassa* als Objekt der biochemischen Genetik und neuerdings durch die Entwicklung der Bakteriengenetik. Aus der Zusammenarbeit zwischen Biochemie und Genetik kann für die Zukunft die Lösung des Problems,

¹¹¹⁾ B. D. Davis (S. 797), C. Gilvarg (S. 812), D. B. Sprinson (S. 817), E. B. Kalan u. P. R. Srinivasan (S. 826) in W. D. McElroy und B. Glass: Amino Acid Metabolism. Johns Hopkins Press, Baltimore 1955.

auf welchem Wege das genetische Material die Ausprägung der Merkmale bei den Lebewesen bewirkt, erwartet werden.

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse über Biosynthesen bei verschiedenen Mikroorganismen lassen die Möglichkeit einer biogenetischen Zuordnung der Mikroorganismen erwarten. So ähnelt das Enzymsystem von *Neurospora crassa* mehr dem der Säugetiere als dem anderer Mikroorganismen¹¹²⁾. Z. B. synthetisiert *Neurospora crassa* Nicotinsäure aus der Aminosäure Tryptophan in gleicher Weise wie das Säugetier. *E. coli* und *B. subtilis* bilden Nicotinsäure aber mit Sicherheit nicht aus Tryptophan¹¹³⁾. Erkenntnisse bei Enterobacteriaceen dürfen also nicht ohne weiteres auf andere Bakterien oder Mikroorganismen übertragen werden.

Eingegangen am 22. Oktober 1959 [A 96]

¹¹²⁾ W. D. McElroy u. B. Glass: Amino Acid Metabolism., Johns Hopkins Press, Baltimore, 1955.

¹¹³⁾ C. Yanofsky, J. Bacteriol. 68, 577 [1954].

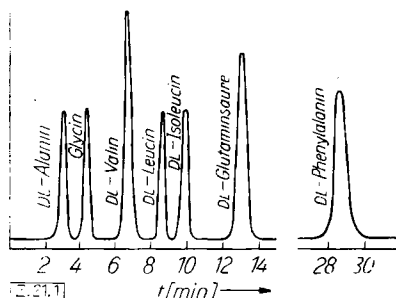
Zuschriften

Gaschromatographie silylierter Aminosäuren

Von Dr. K. RÜHLMANN und W. GIESECKE¹⁾

Institut für Verfahrenstechnik der organischen Chemie, Leipzig und Institut für Organische Chemie der Universität Halle

Die gaschromatographische Trennung von Aminosäure-Derivaten gelang erstmalig E. Bayer²⁾. Die von uns durch Einwirkung von Trimethylchlorsilan auf die Salze von Aminosäuren³⁾ oder von N-Trimethylsilyl-dialkylaminen auf freie Aminosäuren⁴⁾ gewonnenen N-Trimethylsilyl-aminosäure-trimethylsilylester wurden nun ebenfalls gaschromatographisch getrennt. Bedingungen: 280 cm lange Säule; Füllung: 30 % Silikonöl 12500 auf Sterchamol; 165 °C.



Es wurden je 0,001 ml silyliertes DL-Alanin, Glycin, DL-Leucin und DL-Isoleucin und je 0,002 ml silyliertes DL-Valin, DL-Glutaminsäure und DL-Phenylalanin, insgesamt also 0,01 ml eingespritzt. Die quantitative Auswertung des Chromatogramms (Abb. 1) durch Auswiegen der Kurvenabschnitte ergab einen mittleren Fehler von nur 0,5 %. Daraus kann man schließen, daß sich die Wärmeleitfähigkeiten der silylierten Aminosäuren nur sehr wenig unterscheiden.

Da wir sämtliche uns zugänglichen Aminosäuren nahezu quantitativ silylieren konnten, erscheint die neue Methode von besonderer Bedeutung für die Schnellanalyse von Eiweißhydrolysaten.

Eingegangen am 28. November 1960 [Z 21]

¹⁾ 5. Mitt. Über die Si-N-Bindung; 4. Mitt.: K. Rühlmann u. G. Michael, Z. Naturforsch., im Druck. — ²⁾ E. Bayer, K.-H. Reuther u. F. Born, Angew. Chem. 69, 640 [1957]; E. Bayer: Gaschromatographie. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959, S. 82. — ³⁾ K. Rühlmann, J. prakt. Chem. (4) 9, 86 [1959]. — ⁴⁾ L. Birkofer u. A. Ritter, Chem. Ber. 93, 424 [1960]; K. Rühlmann, J. prakt. Chem. (4) 9, 315 [1959].

Abspaltung primärer Arylamine aus Sulfonsäuren in wäßriger Lösung

Von Prof. Dr. F. FEIGL

Laboratório da Produção Mineral, Ministério de Agricultura, Rio de Janeiro (Brasilien)

Aus aromatischen Sulfonsäuren läßt sich mit Raney-Nickel in alkalischer Lösung der aromatische Rest reduktiv abspalten. Erwärmt man z. B. eine alkalische Lösung von Sulfanilsäure mit Raney-Nickel¹⁾, so wird Anilin reduktiv abgespalten und kann in der Gasphase mit geeigneten Reagenspapieren nachgewiesen werden. In der Lösung lassen sich weder S²⁻ noch SO₃²⁻ nachweisen; es entsteht Nickelsulfid, denn beim Lösen des Raney-Nickels in verd. Mineralsäuren bildet sich Schwefelwasserstoff. Es ist anzunehmen, daß an der reduktiven Aufspaltung das im Raney-Nickel enthaltene Nickelhydrid beteiligt ist.:



Mit metallischem Zink oder Devarda-Legierung, die wie Raney-Nickel mit warmer Alkalilauge Wasserstoff entwickeln, wird kein Anilin abgespalten. Analog wie Sulfanilsäure reagieren Metanilsäure, 1- und 2-Naphthylaminsulfonsäuren, Naphthylamindi- und trisulfonsäuren sowie Aryl-nitrosulfonsäuren, deren NO₂-Gruppen zu NH₂ reduziert werden. Ferner lassen sich Derivate der Sulfanilsäure, wie Sulfanilamid und aromatische Sulfone, sowie Anilinselenonsäure, Anilin-arsinsäure und Anilin-stibinsäure mit Raney-Nickel reduktiv zu Anilin spalten.

Diese Reaktionen ermöglichen tüpfelanalytische Nachweise aromatischer Sulfonsäuren und ihrer Derivate und deren Unterscheidung von analogen aliphatischen Verbindungen sowie den Nachweis von minimalen Mengen Raney-Nickel.

Eingegangen am 6. Dezember 1960 [Z 27]

¹⁾ Hersteller: Murex Ltd., England.

Isolierung vielkerniger aromatischer Kohlenwasserstoffe aus Oxydationsprodukten der Steinkohle

Von Prof. Dr. F. MICHEEL und Dipl.-Chem. J. BERNSMANN*)

Organisch-chemisches Institut der Universität Münster/Westf.

Wird Steinkohle¹⁾ mit Luft (150–200 °C) und anschließend mit konz. Salpetersäure (160 °C) oxydiert^{2,3)}, so wird ein Gemisch von Polycarbonsäuren gewonnen. Die nach Abtrennung der Benzolcarbonsäuren³⁾ durch Extrahieren mit Essigester verbleibenden höherkernigen Polycarbonsäuren werden der Decarboxylierung ihrer Kupfer(2)-salze entweder im Autoklaven⁴⁾ (280 °C) oder besser durch Erhitzen in Polyäthylenglykol-monomethyläther auf 200–250 °C unterworfen. Diese Produkte geben bei der Zinkstaub-Destillation und anschließenden Säulenchromatographie des Destillates an Aluminiumoxyd und an partiell acetyliertem Cellulosepulver folgende aromatische Kohlenwasserstoffe: Fluoren⁵⁾, Phenanthren, Anthracen⁵⁾, Fluoranthren, Pyren, 1,2-Benzanthracen, 3,4-Benzfluoranthren, 1,2-Benzpyren, 3,4-Benzpyren und 10,11-Benzfluoranthren. Weitere, im UV-Licht stark fluoreszierende Stoffe wurden bisher nicht identifiziert.

Die gegenüber der Verkokung sehr milden Methoden der Gewinnung der genannten Kohlenwasserstoffe lassen Rückschlüsse auf die Konstitution der Steinkohle zu. Analog nativer Steinkohle verhält sich die vor der Oxydation zur Entfernung von Bitumen mit Benzol unter Druck extrahierte Steinkohle. Bisher waren als mehrkernige Aromaten aus den Oxydationsprodukten der Steinkohle lediglich Naphthalin, Phenanthren und Fluoren bekannt⁶⁻⁸⁾.

Eingegangen am 14. Dezember 1960 [Z 29]

*) Wir danken der Bergbau-Forschung G.m.b.H., Essen, für die Bereitstellung von Mitteln für die Arbeiten. — ¹⁾ Zeche Zweckel, Flöz Hagen. — ²⁾ B. Jüttner, DRP. 743 225. — ³⁾ Dissertation K. G. Beck, Univers. Münster/Westf. 1953 (Großkinsky). — ⁴⁾ Vgl. F. Fischer, Ges. Abhandl. z. Kenntnis der Kohle 6, 79 [1921]. — ⁵⁾ Dissertation J. P. Riebe, Münster/Westf. 1958 (Micheel). — ⁶⁾ J. Entel, J. Amer. chem. Soc. 77, 611 [1955]. — ⁷⁾ R. S. Montgomery, E. D. Holly u. R. S. Gohlke, Fuel [London] 35, 60 [1956]. — ⁸⁾ M. M. Roy, J. appl. Chem. 7, 626 [1957].