

Isolierung aus dem Nährmedium entfällt. Die Bakterien können mehrmals verwendet werden. Erst ab der dritten Inkubation tritt eine geringe Ausbeute-Minderung ein.

Bei der Einwirkung von *P. shermanii* auf δ -Aminolaevulin-säure wird nicht nur Porphobilinogen an das Medium abgegeben. Wir prüfen, ob die weiteren Verbindungen^[3] Zwischenprodukte der Porphyrinbildung oder der Biosynthese des Corrin-Ringes sind.

Arbeitsvorschrift:

Man läßt einen kobaltfreien Ansatz (4 Liter) von *P. shermanii* unter bereits beschriebenen Bedingungen^[4] drei Tage wachsen. Die durch Zentrifugieren gewonnene Bakterienfeuchte-masse (ca. 100 g) wird mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl-Puffer (pH = 8,2)^[5] gewaschen und in 1500 ml des Puffers suspendiert. Nach Zusetzen einer Lösung von 820 mg δ -Aminolaevulin-säure-hydrochlorid in 100 ml Wasser, deren pH-Wert mit NaOH auf 7 eingestellt worden war, inkubiert man 1 Std. bei 70°C unter Rühren und Durchleiten von Stickstoff. Die durch Zentrifugieren von den Bakterien befreite Lösung wird mit verdünnter Salzsäure auf pH = 7,2 eingestellt und auf eine Säule (10 cm Länge, 4,5 cm Durchmesser) aus DEAE-Cellulose (DEAE-Sephadex A-25) gegeben, deren Chlorid-Form mit Tris(hydroxymethyl)amino-methan/HCl-Puffer (pH = 7,2) so lange gewaschen worden war, bis das Eluat pH = 7,2 hatte. Man eluiert mit Puffer, bis kein Porphobilinogen mehr von der Säule kommt, engt im Vakuum auf ca. 1800 ml ein, stellt mit verdünnter Salzsäure auf pH = 4 ein und fällt mit 20-proz. Quecksilber(II)-acetat-Lösung. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, mit 1-proz. Quecksilber(II)-acetat-Lösung gewaschen und in ca. 3 ml Wasser suspendiert. Zur Zersetzung der Quecksilberverbindung leitet man H₂S in die Suspension ein. Man zentrifugiert ab, leitet zur Vertreibung von H₂S Stickstoff durch die Lösung und stellt mit verdünntem Ammoniak auf pH = 4 ein, wobei sich Porphobilinogen als Rohprodukt abscheidet^[6]. Nach 12 Stunden im Kühlschrank wird abzentrifugiert. Im Zentrifugenbecher fügt man die zur Auflösung des Porphobilinogen eben erforderliche Menge 0,5 N Ammoniak hinzu, zentrifugiert vom nicht Gelösten ab, stellt zur Fällung des Porphobilinogen mit Eisessig vorsichtig auf pH = 4 ein und läßt über Nacht im Kühlschrank stehen. Die Kristalle werden abgesaugt, mit eiskalter verdünnter Essigsäure (pH = 4) und gleich anschließend mit wenig kaltem Aceton gewaschen. Man trocknet im Vakuumexsiccator über P₂O₅. Ausbeute: 73 mg Porphobilinogen (12 %).

Eingegangen am 1. August 1967 [Z 588]

[*] Dipl.-Chem. G. Bezold, Dr. G. Müller und Dr. O. Müller
Isotopenlaboratorium der Abteilung für Chemie, Geologie
und Biologie der Universität
7 Stuttgart, Azenbergstraße 14–16

[1] Literaturzusammenstellung: J. E. Falk: Porphyrins und Metalloporphyrins. Elsevier, Amsterdam 1964.

[2] W. Walerych, Acta Biochim. Polon. 10, 243 (1963).

[3] Die Identifizierung der Substanzen befindet sich ebenfalls in Arbeit.

[4] K. Bernhauer, E. Becher u. G. Wilharm, Arch. Biochem. 83, 248 (1959).

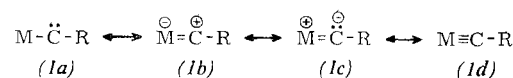
[5] Biochemisches Taschenbuch. 2. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg 1964, 2. Teil, S. 99.

[6] G. H. Cookson u. C. Rimington, Biochem. J. 57, 476 (1954).

Triphenylstannyl- und Trimethylsilyl-äthoxycarbonyl-carben aus Triphenylstannyl- bzw. Trimethylsilyl-diazoessigsäureäthylester

Von U. Schöllkopf und N. Rieber^[*]

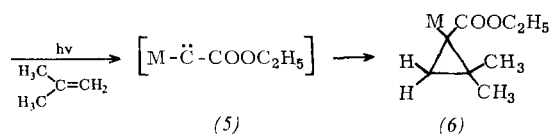
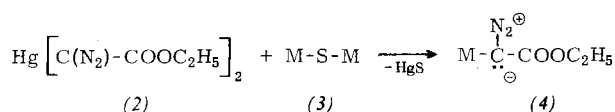
Für metallsubstituierte Carbene sind ungewöhnliche Eigenschaften zu erwarten, weil das Metallatom mit seinen leeren und/oder gefüllten Elektronenbahnen mit den gefüllten und/oder leeren Orbitalen des Carbenkohlenstoffs in Wechselwirkung treten kann [mesomere Grenzstrukturen (1a) bis (1d)].



M = Metall

Als erste metallsubstituierte Carbene konnten wir Triphenylstannyl- und Trimethylsilyl-äthoxycarbonyl-carben (5) darstellen, indem wir Triphenylstannyl- bzw. Trimethylsilyl-diazoessigsäureäthylester (4) [$\nu(\text{N}_2) = 2080 \text{ cm}^{-1}$ für (4a), 2090 cm^{-1} für (4b), $\nu(\text{CO}) = 1670 \text{ cm}^{-1}$ für (4a), 1685 cm^{-1} für (4b)] in Isobuten bis zur Entfärbung der Lösung photolysierten^[1]. Dabei entstanden mit 35 bzw. 49 % Ausbeute 1-Triphenylstannyl- bzw. 1-Trimethylsilyl-1-äthoxycarbonyl-2,2-dimethylcyclopropan (6) [$\nu(\text{CO}) = 1710 \text{ cm}^{-1}$ für (6a), 1715 cm^{-1} für (6b); NMR: AB-Spektrum der Cyclopropylprotonen; $\tau = 8,7$ (CCl₄), $J_{\text{AB}} = 4,5 \text{ Hz}$ für (6a), $\tau = 9,0$ (C₆D₆), $J_{\text{AB}} = 4 \text{ Hz}$ für (6b)]. Die Addukte (6) wurden durch Chromatographie über Kieselgel (eluiert mit Petroläther/Äther = 5:1) isoliert.

Die Ausgangsstoffe (4a) und (4b) gewannen wir mit 95 bzw. 75 % Ausbeute durch 5- bzw. 3-stündiges Erhitzen von Quecksilber-bis-diazoessigsäure-äthylester (2)^[2] in Benzol (80°C) mit etwas mehr als einem Äquivalent Bis-triphenylstannyl- bzw. Bis-trimethylsilyl-sulfid (3a) bzw. (3b). Zur Isolierung wurde filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer (30°C/12 Torr) vom Benzol befreit.



(a), M = Sn(C₆H₅)₃

(b), M = Si(CH₃)₃

Eingegangen am 1. August 1967 [Z 589]

[*] Prof. Dr. U. Schöllkopf und Dr. N. Rieber
Organisch-Chemisches Institut der Universität
34 Göttingen, Windausweg 2

[1] Bedingungen: -7°C, Hanovia Hg-Hochdrucklampe 450 Watt, Pyrexfilter: bei (4a) 0,0025 m, 3 Std.; bei (4b) 0,003 m, 8 Std.

[2] Vgl. F. Gerhart, U. Schöllkopf u. H. Schumacher, Angew. Chem. 79, 50 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. 6, 74 (1967).

Thermophile und mesophile Amino-peptidasen aus Bacillus stearothermophilus^[1]

Von H. Zuber und G. Roncari^[*]

Aus mehreren Stämmen von Bacillus stearothermophilus^[2] konnten wir drei Amino-peptidasen isolieren, die sich in Molekulargewicht, Thermostabilität und Substratspezifität unterscheiden. Amino-peptidase I (AP I) ist thermostabil und wird daher als thermophiles Enzym bezeichnet. Die Amino-peptidasen II und III (AP II und AP III) sind mesophile Enzyme und thermolabil. Alle drei Enzyme sind Metalloenzyme. In der nativen Form dürften sie als Co²⁺- oder Mn²⁺-Enzyme vorliegen, da Co²⁺ und Mn²⁺ nach Inaktivierung der Enzyme mit EDTA am besten reaktivieren (Co²⁺ = Mn²⁺ > Mg²⁺ > Ni²⁺ > Cd²⁺). Ca²⁺, Zn²⁺ und Fe²⁺ aktivieren nicht, sondern hemmen in Konzentrationen von 0,001 bis 0,05 M. Das pH-Optimum aller drei Enzyme liegt bei pH = 7,5 bis 9. Die Substratspezifität (Tabelle 2) ist zum Teil stark verschieden von der Spezifität der Leucinamino-peptidase (LAP)^[3] aus Schweinenieren.