

120 °C und 10⁻² Torr wurden daraus 360 mg 8-Hydroxychinolincarbonsäure-2 (7) gewonnen. (Schmp. 210 °C unter Zers.)

Ausbeute: 360 mg = 82% d. Theorie.

2.4.3. 8-Hydroxychinolincarbonsäure-2-methylester (2)

360 mg 7 wurden in 30 ml mit HCl-Gas gesättigtem abs. Methanol 12 Stdn. am Rückfluß gekocht und die Lösung im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Der gelbe Rückstand wurde in Äther mit wäßriger Hydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und die Lösung mit Na₂SO₄ getrocknet. Der nach dem Abziehen des Äthers erhaltene gelbe Rückstand wurde bei 65–70 °C und 10⁻² Torr sublimiert und aus Äther/Petroläther 40–60 °C (2 : 1) umkristallisiert. Die nach dem Umkristallisieren blaßgelben Kristalle des 8-Hydroxychinolincarbonsäure-2-methylester (2) schmolzen bei der ersten Messung bei 97,5–99 °C; bei er-

neuter Messung derselben Probe nach dem Auskristallisieren fanden wir 73–76 °C.

Ausbeute: 240 mg = 62% d. Theorie.

2.4.4. Deuterierung von 2

10 mg 2 wurden in 1 ml abs. THF gelöst und mit 1 ml D₂O drei Stdn. bei 50 °C stehengelassen. Nach dem Eindampfen der Lösung im Stickstoffstrom wurde der kristalline, hellgelbe Rückstand sofort massenspektrometrisch untersucht.

Die Untersuchungen sind ermöglicht worden durch die dankenswerten Unterstützungen der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Dr. Otto Röhm-Gedächtnis-Stiftung und dem Fonds der Chemischen Industrie. Herr SCHÄFLEIN (Straubing) war uns beim Fangen der Käfer sehr behilflich und Herr Dr. JOCHIMS (Heidelberg) hat die mit einem HA-100-Spektrometer aufgenommenen NMR-Spektren angefertigt.

Gewinnung von Porphobilinogen aus δ -Aminolävulinsäure mit Zellsuspensionen von *Propionibacterium shermanii*

GERHARD MÜLLER und GUNTER BEZOLD

Isotopenlaboratorium der Abteilung Chemie, Geologie und Biologie der Universität Stuttgart

(Z. Naturforschg. 24 b, 47–53 [1969]; eingegangen am 20. Juli 1968)

Zellsuspensionen von *P. shermanii* wandeln δ -Aminolävulinsäure rasch in Porphobilinogen um und geben dieses an das Inkubationsmedium ab. Bei Beachtung der optimalen Inkubationsbedingungen, die durch mehrere Versuchsserien ermittelt wurden, eignet sich das Verfahren zur Gewinnung von Porphobilinogen.

Porphobilinogen ist ein Zwischenprodukt der Biosynthese der natürlichen Tetrapyrrole, wie z. B. der Porphyrine, der Corrinoide und der Chlorophylle. Da es schwer zugänglich ist, aber beim Studium der Biosynthese der erwähnten Naturstoffe dringend benötigt wird, entwickelten wir ein Verfahren zur Gewinnung größerer Mengen des Precursors.

Bisher wurde Porphobilinogen aus dem Harn von an akuter Porphyrie erkrankten Patienten oder aus dem Urin von Kaninchen isoliert, denen Sedormid oder andere Porphyrie induzierende Verbindungen verabreicht worden waren¹. Auch chemische Synthe-

sen des Porphobilinogen wurden durchgeführt^{1, 2}; sie sind jedoch mit einem relativ großen Aufwand verbunden, obwohl in jüngster Zeit eine wesentliche Vereinfachung erreicht wurde³. Porphobilinogen entsteht auch bei der Umwandlung von δ -Aminolävulinsäure durch δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase enthaltende Enzympräparationen^{1, 4–7}. Als besonders vorteilhaft erwies sich die Gewinnung von Porphobilinogen aus δ -Aminolävulinsäure mit Zellsuspensionen von *P. shermanii*⁸. In der vorliegenden Mitteilung berichten wir ausführlich über die erzielten Ausbeuten in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen.

¹ Literaturzusammenstellung: J. E. FALK: Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1964.

² G. P. ARSENAULT and S. F. MACDONALD, Can. J. Chem. **39**, 2043 [1961].

³ H. PLEININGER, P. HESS u. J. RUPPERT, Chem. Ber. **101**, 240 [1968].

⁴ W. WALERYCH, Acta biochim. polon. **10**, 243 [1963].

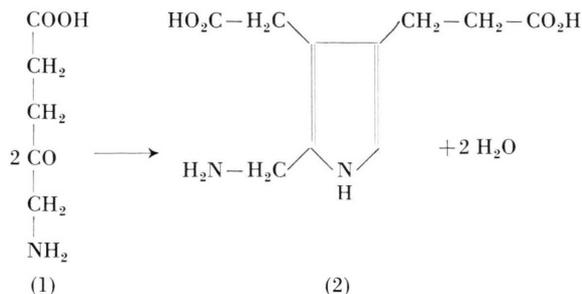
⁵ D. L. COLEMAN, J. biol. Chemistry **241**, 5511 [1966].

⁶ D. L. NANDI, K. F. BAKER-COHEN, and D. SHERMIN, J. biol. Chemistry **243**, 1224 [1968].

⁷ B. F. BURNHAM and J. LASCELLES, Biochem. J. **87**, 462 [1963].

⁸ G. BEZOLD, G. MÜLLER u. O. MÜLLER, Angew. Chem. **79**, 905 [1967].

In Anlehnung an die enzymchemische Bildung von Porphobilinogen (2) aus δ -Aminolävulinsäure (1)



versuchten wir, diese Reaktion gärungschemisch durchzuführen. Von den untersuchten Mikroorganismen, wie z. B. *E. coli*, *P. shermanii* und *P. arabinosum*, die bei Zugabe von δ -Aminolävulinsäure während der Fermentation Porphobilinogen an das Kulturmedium abgeben, lieferten die Propionsäurebakterien besonders gute Ausbeuten. Während in zellfreien Extrakten von *Clostridium thermoaceticum* eine δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase nachgewiesen wurde⁹, deren Anreicherung z. Z. bearbeitet wird, konnte bei der Fermentation von *Clostridium thermoaceticum* in Gegenwart von δ -Aminolävulinsäure im Gärmedium kein Porphobilinogen, wohl aber Porphyrine, nachgewiesen werden⁹.

Die Isolierung von Porphobilinogen aus Gärmedien ist wegen der vielen darin enthaltenen Begleitstoffe ziemlich aufwendig. Deshalb bedeutete die Beobachtung, daß Porphobilinogen auch bei der Inkubation von Zellsuspensionen obiger Mikroorganismen in geeigneten Pufferlösungen bei Zugabe von δ -Aminolävulinsäure gebildet wird, einen wesentlichen Fortschritt. Die Ausbeute des auf diese Weise gewonnenen Porphobilinogens ist einerseits abhängig von der Bildungsgeschwindigkeit des Porphobilinogens, wird aber andererseits stark beeinflusst von den Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmter Folgereaktionen des wenig stabilen Porphobilinogens in Richtung verschiedener Kondensationsprodukte, die z. T. rein chemisch entstehen, andererseits aber auch enzymchemisch in den Zellen gebildet werden. Weiterhin spielen Transportvorgänge eine Rolle, da δ -Aminolävulinsäure von der Zelle aufgenommen und das Reaktionsprodukt Porphobilinogen wieder durch die Zellmembran hindurchtransportiert werden muß. Dieses komplexe Zusammenspiel zahlreicher z. T. konkurrierender Faktoren kann nur durch empirisch bestimmte Reaktionsparameter zur Porphobilinogen-Gewinnung ausgenutzt werden.

Stabilität von Porphobilinogen und δ -Aminolävulinsäure

Wir untersuchten die Stabilität von Porphobilinogen und δ -Aminolävulinsäure in Tris/HCl-Puffer von pH 8,2. Bei 70 °C ist Porphobilinogen relativ unbeständig (s. Abb. 1), so daß nach 1 Stde. nur noch 45% unverändert vorliegen. Zellen von *P. shermanii* beschleunigen die Umwandlung des Porphobilinogens, jedoch überwiegt der Anteil der rein chemischen Weiterreaktion. δ -Aminolävulinsäure ist da-

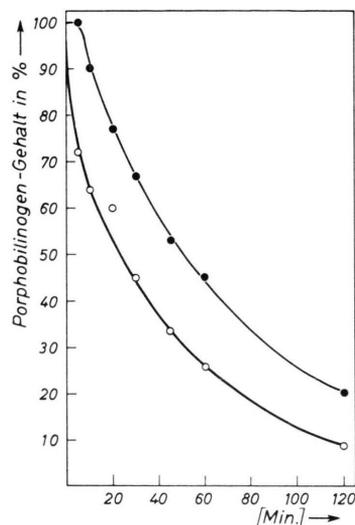


Abb. 1. Stabilität von Porphobilinogen bei 70 °C und pH 8,2. —●—●— in Tris/HCl-Puffer (0,05-m. an Tris), —○—○— in Zellsuspensionen von *P. shermanii* (Zelldichte: 70 mg Bakterienfeuchtmasse/ml) in Tris-HCl-Puffer (0,05-m. an Tris). Jeweils 2,8 ml Puffer bzw. Zellsuspension wurden bei 70 °C mit 0,2 ml einer $2 \cdot 10^{-3}$ -m. Porphobilinogen-Lösung versetzt und verschiedene Zeiten bei dieser Temperatur gehalten.

gegen unter obigen Bedingungen wesentlich stabiler: Nach 1 Stde. bei 70 °C waren noch annähernd 90% der ursprünglichen Menge vorhanden (s. Tab. 1).

Zeit in min.	δ -Aminolävulinsäure-Konzentration	
	in $\mu\text{Mol}/3 \text{ ml}$	in % der Ausgangskonzentration
0	2000	100
30	1940	97
60	1760	88
120	1700	85

Tab. 1. Stabilität einer wäßrigen δ -Aminolävulinsäure-Lösung. Jeweils 2,8 ml Tris/HCl-Puffer (pH 8,2; 0,05-m. an Tris) wurden bei 70 °C mit 0,2 ml einer 0,01-m. δ -Aminolävulinsäure-Lösung versetzt und verschiedene Zeiten bei dieser Temperatur gehalten.

⁹ W. DIETERLE, Diplomarbeit, Universität Stuttgart, 1968.

Bei 37 °C geht die Weiterreaktion des Porphobilinogens bedeutend langsamer vor sich; auch hier reagiert der größere Teil rein chemisch weiter (s. Abb. 2).

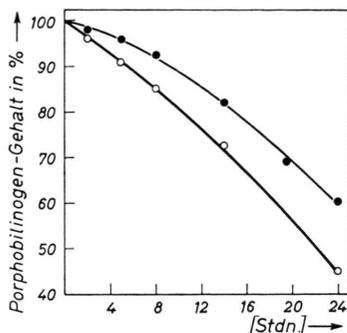


Abb. 2. Stabilität von Porphobilinogen bei 37 °C und pH 8,2. —○— in Tris/HCl-Puffer, —●— in Zellsuspensionen von *P. shermanii*. Sonstige Versuchsbedingungen wie bei Abb. 1 beschrieben.

Umwandlung von δ -Aminolävulinsäure in Phorphobilinogen mittels *P. shermanii*

δ -Aminolävulinsäure- und Porphobilinogen-Konzentration als Funktion der Inkubationszeit. Bei der Inkubation von δ -Aminolävulinsäure mit Zellsuspensionen von *P. shermanii* nimmt der Porphobilino-

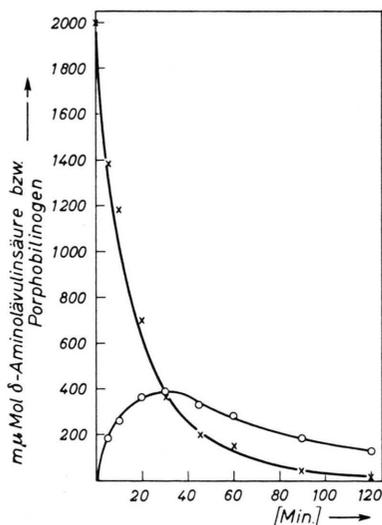


Abb. 3. Porphobilinogen-Bildung durch Zellsuspensionen von *P. shermanii*. —○— Verlauf des Porphobilinogen-Gehaltes während der Inkubation, —x—x— Abnahme des δ -Aminolävulinsäure-Gehaltes. Jeweils 2,8 ml einer Suspension von *P. shermanii* in Tris/HCl-Puffer (pH 8,2; 0,05-m. an Tris; Zelldichte: 70 mg Bakterienfeuchtmass/ml) wurden bei 70 °C mit 0,2 ml einer 0,01-m. δ -Aminolävulinsäure-Lösung (pH 8,2) versetzt und verschiedene Zeiten bei dieser Temperatur inkubiert.

gen-Gehalt nicht entsprechend dem δ -Aminolävulinsäure-Verbrauch zu (s. Abb. 3), da Porphobilinogen unter Bildung verschiedener Kondensationsprodukte weiterreagiert (vgl. Abbn. 1 und 2). Der Porphobilinogen-Gehalt erreicht nach 30 Min. ein Optimum, während die auf umgesetzte δ -Aminolävulinsäure bezogene Ausbeute ihren Höchstwert bereits nach 10 Min. hat (s. Abb. 4). Bei sehr langer Inkubation entstehen aus δ -Aminolävulinsäure fast ausschließlich die Folgeprodukte des Porphobilinogens.

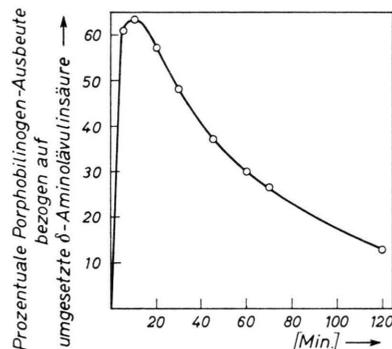


Abb. 4. Prozentuale Ausbeute an Porphobilinogen bezogen auf umgesetzte δ -Aminolävulinsäure bei der Inkubation mit Zellsuspensionen von *P. shermanii* (Versuchsbedingungen wie bei Abb. 3 beschrieben).

Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Die Porphobilinogen-Bildung durch Zellsuspensionen von *P. shermanii* hängt sehr stark von der Temperatur ab. Die besten Ausbeuten werden sowohl in neutralem als auch in alkalischem Medium bei 70 °C erzielt (s. Abb. 5). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß das Temperaturoptimum der aus *P. shermanii* gewonnenen δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase bei 60 °C liegt⁴, und die aus *Rhodopseudomonas spheroides*⁶ sowie aus Mäuseleber⁵ isolierten δ -Aminolävulinsäure-Dehydratasen relativ hitzestabil sind.

Auffallend ist die große Hitzestabilität der Zellen von *P. shermanii*, deren Fermentation bei 28–30 °C durchgeführt wird: Der Mikroorganismus hatte seine Wachstumsfähigkeit nach einer Inkubationsdauer von 30 Min. bei 70 °C nicht völlig eingebüßt, wie die Beimpfung eines für *P. shermanii* geeigneten Kulturmediums mit so vorbehandeltem Zellmaterial zeigte.

Einfluß des pH-Wertes. Die Umwandlung von δ -Aminolävulinsäure durch Zellsuspensionen von *P. shermanii* gelingt am besten in alkalischem Medium (s. Abb. 6). Das pH-Optimum ist von der Art des Puffers abhängig und liegt in Phosphat-Puffer nach

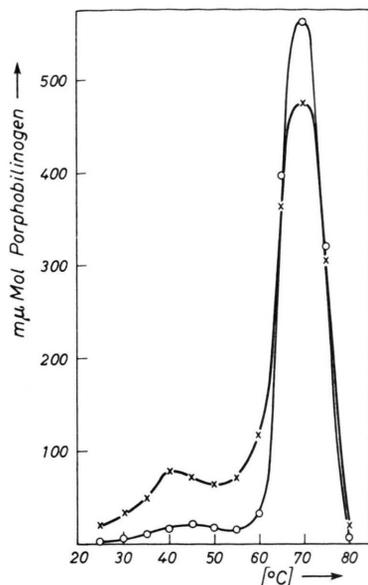


Abb. 5. Porphobilinogen-Bildung durch Zellsuspensionen von *P. shermanii* in Abhängigkeit von der Inkubations-Temperatur. —x—x— in Phosphat-Puffer von pH 7,0, —o—o— in Tris/HCl-Puffer von pH 8,2. Jeweils 2,8 ml einer Suspension von *P. shermanii* (Zelldichte: 100 mg Bakterienfeuchtmasse/ml Suspension) in Phosphat-Puffer nach Sørensen (pH 7,0; 1/15-m. an Phosphat) bzw. in Tris/HCl-Puffer (pH 8,2; 0,05-m. an Tris) wurden mit 0,2 ml δ -Aminolävulinsäure-Lösung (0,01-m.; pH 7,0 bzw. 8,2) versetzt und 30 Min. bei verschiedenen Temperaturen inkubiert.

Sørensen bei pH 7,6, in Tris/HCl-Puffer bei pH 8,2 und in Glycin/NaOH-Puffer bei pH 9,1. Auch die bei den optimalen pH-Werten der verschiedenen Puffer gebildeten Porphobilinogen-Mengen variieren: so sind die in Phosphatpuffer erzielten Ausbeuten am geringsten, während sich der Glycin/NaOH-Puffer als besonders günstig erwies. Die höhere Ausbeute in diesem Medium ist aber nicht auf eine Verwertung von Glycin zur enzymchemischen Bildung von δ -Aminolävulinsäure zurückzuführen.

Enzympräparationen von δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase aus verschiedenem biologischem Material besitzen kein einheitliches pH-Optimum: Bei den aus Leber und Erythrocyten isolierten Enzymen liegt es im schwach sauren Bereich^{5, 10-12}, während die Porphobilinogen-Bildung mit δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase aus *P. shermanii* in Phosphatpuffer bei pH 7⁴ und aus *R. spheroides* bei pH 8¹³ bzw. bei pH 8,5⁶ am günstigsten verläuft. — Die Art des

¹⁰ K. D. GIBSON, A. NEUBERGER, and J. J. SCOTT, *Biochem. J.* **61**, 618 [1955].

¹¹ S. GRANICK, *Science* [Washington] **120**, 1105 [1954].

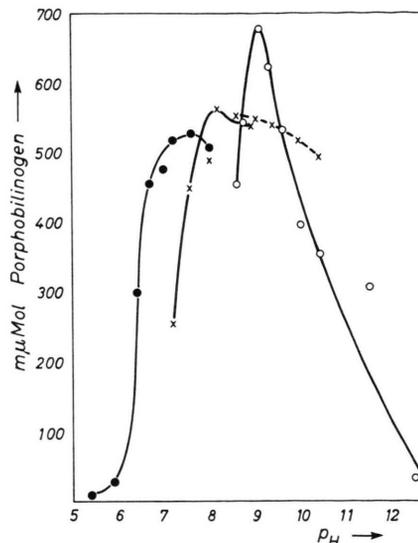


Abb. 6. Porphobilinogen-Bildung durch Zellsuspensionen von *P. shermanii* in Abhängigkeit vom pH. —●—●— in Phosphatpuffer nach Sørensen (1/15-m. an Phosphat), —x—x— in Tris/HCl-Puffer (0,05-m. an Tris), —o—o— in Bis/HCl-Puffer (0,05-m. an Bis), —o—o— in Glycin/NaOH/NaCl-Puffer*. Jeweils 2,8 ml einer Suspension von *P. shermanii* (Zelldichte: 100 mg Bakterienfeuchtmasse/ml Suspension) in den verschiedenen Puffern wurden bei 70 °C mit 0,2 ml einer 0,01-m. δ -Aminolävulinsäure-Lösung versetzt und bei dieser Temperatur 30 Min. inkubiert. * *Biochem. Taschenbuch*, II. Teil, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1964, S. 90.

Puffers ist auch bei gereinigten Enzymen von mehr oder weniger großem Einfluß: So ist z. B. die δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase aus Rindsleber in Tris-Puffer inaktiv¹⁰.

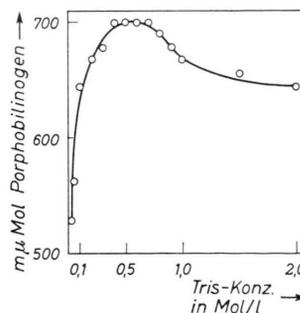


Abb. 7. Porphobilinogen-Bildung durch Zellsuspensionen von *P. shermanii* als Funktion der Pufferkonzentrationen. Jeweils 2,8 ml einer Suspension von *P. shermanii* in Tris/HCl-Puffer (pH 8,2) verschiedener Konzentration (Zelldichte: 100 mg Bakterienfeuchtmasse/ml) wurden bei 70 °C mit 0,2 ml einer 0,01-m. δ -Aminolävulinsäure-Lösung (pH 8,2) versetzt und bei dieser Temperatur 30 Min. inkubiert.

¹² S. GRANICK and D. MAUZERALL, *J. biol. Chemistry* **232**, 1119 [1958].

¹³ B. F. BURNHAM and J. LASCELLES, *Biochem. J.* **87**, 462 [1963].

Auch die Pufferkonzentration wirkt sich auf die Umwandlung von δ -Aminolävulinsäure durch *P. shermanii* aus (s. Abb. 7): Bei Tris/HCl-Puffer verzeichnet man bis zu einer Konzentration von ca. 0,6-m. an Tris eine Zunahme der Porphobilinogen-Menge; höhere Pufferkonzentrationen führen zu einer allmählichen Ausbeuteminderung.

Abhängigkeit von der δ -Aminolävulinsäure-Konzentration. Die gebildete Porphobilinogen-Menge nimmt mit steigender δ -Aminolävulinsäure-Konzentration zu (s. Tab. 2). Die Ausbeute bezogen auf zugesetzte δ -Aminolävulinsäure erreicht bei Zugabe von 1 μ Mol δ -Aminolävulinsäure pro 3 ml Inkubationsvolumen mit 62% ihr Maximum (s. Abb. 8), fällt dann allmählich ab und beträgt bei Zugabe von 100 μ Mol nur noch 6 Prozent.

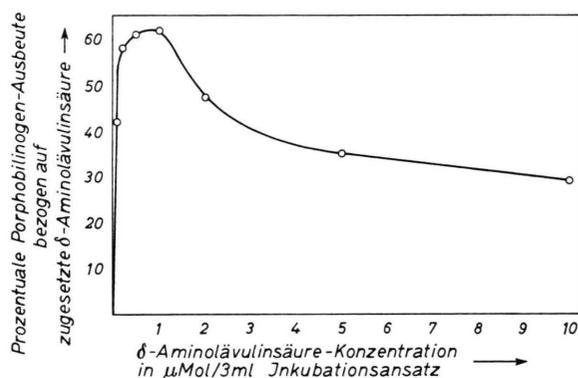


Abb. 8. Porphobilinogen-Bildung mit Zellsuspensionen von *P. shermanii*. Auf zugesetzte δ -Aminolävulinsäure bezogene Porphobilinogen-Ausbeute (Versuchsbedingungen wie bei Tab. 2 beschrieben).

Je Inkubationsansatz zugegebene δ -Aminolävulinsäure [μ Mol]	Porphobilinogen-Gehalt je Inkubationsansatz [$m\mu$ Mol]
0,1	21
0,2	58
0,5	152
1,0	310
2,0	470
5,0	870
10,0	1440
20,0	1635
50,0	2790
100,0	3080

Tab. 2. Abhängigkeit der gebildeten Porphobilinogen-Menge von der δ -Aminolävulinsäure-Konzentration. Jeweils 2,8 ml einer Suspension von *P. shermanii* in Tris/HCl-Puffer (pH 8,2; 0,05-m. an Tris; Zelldichte: 100 mg Bakterienfeuchtmasse/ml Suspension) wurden bei 70 °C mit 0,2 ml δ -Aminolävulinsäure-Lösungen verschiedener Konzentration, die auf pH 8,2 eingestellt wurden, versetzt und bei dieser Temperatur 30 Min. inkubiert.

Einfluß der Zelldichte. Die Messung der Abhängigkeit der Porphobilinogen-Bildung von der Zelldichte wurde bei hoher δ -Aminolävulinsäure-Konzentration (20 μ Mol δ -Aminolävulinsäure je Inkubationsansatz) durchgeführt, um einer eventuellen Verfälschung der Meßwerte bei hohen Zelldichten durch Mangel an δ -Aminolävulinsäure vorzubeugen. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, wird die optimale Zelldichte bei ca. 90 mg Bakterienfeuchtmasse pro ml Suspension erreicht.

Zelldichte in mg Bakterienfeuchtmasse pro ml Suspension	Porphobilinogen-Gehalt pro Inkubationsansatz [$m\mu$ Mol]
4,58	147
9,15	326
18,30	564
36,60	976
55,00	1280
73,30	1456
91,50	2330
110,00	2140
128,30	2060
151,00	2140
174,00	2200

Tab. 3. Abhängigkeit der Porphobilinogen-Bildung von der Zelldichte. Jeweils 3,8 ml einer Suspension von *P. shermanii* in Tris/HCl-Puffer von pH 8,2 (0,05-m. an Tris; Zelldichte wie in der Tabelle angegeben) wurden bei 70 °C mit 0,2 ml einer 0,1-m. δ -Aminolävulinsäure-Lösung, die auf pH 8,2 eingestellt worden war, versetzt und bei dieser Temperatur 30 Min. inkubiert.

Einfluß verschiedener Elektrolyte bzw. organischer Verbindungen. Nur in wenigen Fällen konnte durch Zusätze eine geringfügige Steigerung der Porphobilinogen-Ausbeute erzielt werden (s. Tab. 4). Schwermetall-Ionen, wie Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} und Pb^{2+} führen rasch zur Inaktivierung der Zellen, während andere Zusätze die Porphobilinogen-Gewinnung in unterschiedlichem Maße beeinträchtigen (s. Tab. 4).

Folgende Substanzen ** waren ohne Einfluß: $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$, $K_3[Fe(CN)_6]$, $CaCl_2$, $CoSO_4$, $NaCl$, $KSCN$, KJ , K_2HPO_4 , NaF , Hydrazin, 3-Amino-1.2.4-triazol, Hydroxylamin-hydrochlorid, 2.4-Dinitro-phenol, 2-Jod-acetamid, Sedormid, Ascorbinsäure, Glutathion in oxydierter und reduzierter Form, Cystein, Mercaptoäthanol und Sulfathiazol.

** Endkonzentration im Inkubationsansatz: 10⁻³-m. mit Ausnahme von Sedormid. Von diesem wurden 0,3 ml einer bei 70 °C gesättigten Lösung zugesetzt.

Zusätze	Endkonzentration der Zusätze im Inkubations-Gemisch	relativer Porphobilinogen-Gehalt pro Inkubationsansatz (Normalansatz = 100)
—	—	100
KCl	10 ⁻³ -m.	105
KCN		106
K ₄ [Fe(CN) ₆]		106
FeCl ₃		106
MnSO ₄		106
NH ₄ Cl		107
Al ₂ (SO ₄) ₃		83
HgCl ₂ *		0
AgNO ₃ *		0
Pb(OAc) ₂ *		0
CuCl ₂		0
Semicarbazid		93
Harnstoff		92
Dimedon		91
Imidazol		90
Idranal		47
p-Chlor-mercuribenzoessäure-Natrium		2,8 · 10 ⁻² -m.
Glucose	93	

Tab. 4. Einfluß verschiedener Zusätze auf die Porphobilinogen-Bildung. Jeweils 2,5 ml einer Suspension von *P. shermanii* in Tris/HCl-Puffer pH 8,2 (0,5-m. an Tris; Zelldichte: 80 mg Bakterienfeuchtmasse pro ml Suspension) wurden bei 70 °C mit 0,3 ml einer Lösung des Zusatzes (Endkonzentration der Zusätze im Inkubationsgemisch wie in der Tabelle angegeben) und 0,2 ml einer 0,01-m. δ -Aminolävulinsäure-Lösung versetzt und 30 Min. bei dieser Temperatur inkubiert. * Die tatsächliche Schwermetallionen-Konzentration ist hier bedeutend kleiner, da der Puffer Chloridionen enthält.

Eigenschaften der zur Porphobilinogen-Gewinnung benutzten Zellen von *P. shermanii*

Im Hinblick auf die Verwendung von Zellsuspensionen von *P. shermanii* zur Umwandlung von δ -Aminolävulinsäure in Porphobilinogen wurden einige Eigenschaften des Mikroorganismus näher studiert.

Gärführung. Eine Enzyminduktion bei Zugabe von δ -Aminolävulinsäure zum Gärmedium wurde nicht beobachtet. Die dabei erhaltenen Zellen ergaben bei anschließender Inkubation keine höhere Porphobilinogen-Ausbeute als Zellen, die ohne Zusatz von δ -Aminolävulinsäure gezüchtet wurden. Auch durch Zusatz von Co²⁺-Ionen zum Kulturmedium ließ sich die Aktivität der Zellen nicht steigern.

Ferner prüften wir die Aktivität von *P. shermanii* in Abhängigkeit von der Fermentationsdauer. Hierzu wurde einem Gäransatz während 11 Tagen täglich eine Probe entnommen und die darin enthaltenen Zellen mit δ -Aminolävulinsäure inkubiert. Die

erzielten Porphobilinogen-Werte blieben während der ganzen Zeit konstant.

MENON und SHEMIN berichten, daß sich die Enzymaktivitäten der δ -Aminolävulinsäure-Dehydratasen in zellfreien Extrakten von *P. shermanii*, welche anaerob bzw. aerob gezüchtet wurden, stark unterscheiden. So beträgt die Aktivität in Extrakten von aerob kultivierten Zellen höchstens 10% der Aktivität von Extrakten aus Zellen, die anaerob geführt wurden¹⁴. Dagegen ergaben unsere Versuche, daß Suspensionen von aerob bzw. anaerob gezüchteten Zellen von *P. shermanii* keine Aktivitätsunterschiede hinsichtlich der Porphobilinogen-Bildung zeigen. Selbstverständlich ist aber die Bakterienausbeute bei anaerob gezüchteten Kulturen von *P. shermanii* höher als bei aerob geführten.

Lagerfähigkeit von *P. shermanii*. Bakterienfeuchtmasse, Acetontrockenbakterien und gefriergetrocknete Zellen von *P. shermanii* wurden 3 Monate bei -20 °C aufbewahrt, ohne daß ein Aktivitätsverlust auftrat.

Porphobilinogen-Gewinnung mit verschieden vorbehandelten Zellen von *P. shermanii*. Die Aktivitäten von Bakterienfeuchtmasse, Acetontrockenbakterien und gefriergetrockneten Zellen haben bei einmaliger Inkubation denselben Wert (s. Tab. 5). Bei mehrmaliger Inkubation des gleichen Materials ist die

Art der Zellen von <i>P. shermanii</i> entsprechend ihrer Vorbehandlung	Gebildete relative Porphobilinogen-Menge je Ansatz (1. Inkubation der Bakterienfeuchtmasse = 100)			
	1. Inkubation	2. Inkubation	3. Inkubation	4. Inkubation
Bakterienfeuchtmasse	100	101	95	82
Gefriergetrockn. Zellen	100	93	77	54
Acetontrockenbakterien	100	99	81	55

Tab. 5. Porphobilinogen-Bildung bei wiederholt verwendeten Zellen von *P. shermanii* verschiedener Vorbehandlung. Jeweils 2,8 ml einer Suspension von *P. shermanii* in Tris/HCl-Puffer (pH 8,2; 0,05-m. an Tris; Zelldichte: 50 mg Bakterienfeuchtmasse/ml Suspension bzw. auf diesen Wert bezogene Mengen an Acetontrockenbakterien und gefriergetrockneten Zellen) wurden bei 70 °C mit 0,2 ml einer 0,01-m. δ -Aminolävulinsäure-Lösung versetzt und 30 Min. bei dieser Temperatur inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde das Zellmaterial abzentrifugiert, mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und anschließend wieder in obigem Puffer suspendiert.

¹⁴ A. MENON and D. SHEMIN, Arch. Biochem. Biophysics **121**, 304 [1967].

Verwendung von Bakterienfeuchtmasse am günstigsten. Mit diesen Zellen sind drei aufeinander folgende Inkubationen mit praktisch gleicher Porphobilinogen-Ausbeute möglich.

Experimenteller Teil

*Fermentation von P. shermanii*¹⁵. Die Gärungen mit *P. shermanii* wurden in 10-l-Steilbrustflaschen mit je 7 l Medium bei 28–30 °C durchgeführt. Das Nährmedium setzte sich wie folgt zusammen [g]: 385 Cornsteep-Trockenpulver, 17,5 Bacto-Yeast Extract, 12,3 NaH₂PO₄, 12,3 K₃PO₄, 2,8 MgCl₂·6 H₂O, 0,07 FeSO₄, 7 l H₂O. Die angeführten Bestandteile wurden in der angegebenen Menge H₂O gelöst bzw. suspendiert. Dann wurde das pH auf 6,9 eingestellt (mit KOH), und ca. 45 Min. bei 120 °C im Autoklaven erhitzt. Nach dem Erkalten filtrierte man vom Ungelösten ab und stellte den pH-Wert, der beim Erhitzen absank, erneut auf 6,9 ein. Anschließend wurde das Gärmedium bei 120 °C im Autoklaven während 60 Min. sterilisiert. Zur Beimpfung dienten 700 ml Impfkultur, deren Medium sich wie oben beschrieben zusammensetzte. Durch tägliche Zugabe von 140 ml steriler 50-proz. Glucose-Lösung (der Glucose-Gehalt soll ungefähr 1% betragen) und Einstellen des pH mittels steriler, gesättigter Soda-Lösung auf 6,8 wurde die Gärung während der jeweils angegebenen Gärdauer in Gang gehalten. Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert und mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen.

Inkubation von δ -Aminolävulinsäure mit Zellsuspensionen von P. shermanii. Die Inkubationsansätze (s. Abb. 1–8 bzw. Tab 2–5) zur Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen bestanden meist aus 2,8 ml Zellsuspension und 0,2 ml δ -Aminolävulinsäure-Lösung. Nach Ablauf der gewählten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml einer Trichloressigsäure und HgCl₂ enthaltenden Lösung (80 ml 10-proz. Trichloressigsäure und 20 ml 0,2 m HgCl₂) abgebrochen. Nach Abzentrifugieren der Zellmasse wurde Porphobilinogen spektrophotometrisch nach MAUZERALL und GRANICK¹⁶ durch Messung der Extinktion bei 555 m μ bestimmt, wobei Ehrlich's Reagenz (2 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml 6-n. HCl) mit 5 g HgCl₂ je 100 ml Lösung versetzt wurde. δ -Aminolävulinsäure wurde mit Hilfe der Pikratmethode nach ELLIOTT¹⁷ durch Messung der Extinktion bei 495 m μ bestimmt.

Gewinnung von Porphobilinogen. Man läßt einen Gäransatz von *P. shermanii* unter oben beschriebenen Bedingungen 3 Tage wachsen. Die durch Zentrifugieren gewonnene Bakterienfeuchtmasse wird mit physio-

logischer NaCl-Lösung und anschließend mit Tris/HCl-Puffer (pH 8,2; 0,05-m. an Tris) gewaschen.

100 g Bakterienfeuchtmasse werden in 915 ml Tris/HCl-Puffer gleicher Zusammensetzung suspendiert. Diese Suspension wird unter Rühren und Durchleiten von N₂ auf 70 °C erwärmt, mit einer Lösung von 600 mg δ -Aminolävulinsäure-hydrochlorid (dargestellt nach NEUBERGER und SCOTT¹⁸) in 70 ml H₂O, deren pH mit Tris-Lösung auf 8,2 eingestellt wurde, versetzt und unter weiterem Rühren und Durchleiten von N₂ 30 Min. bei 70 °C inkubiert.

Man kühlt das Inkubationsgemisch ab, entfernt die Zellmasse durch Zentrifugieren und stellt das pH der Lösung mit verdünnter HCl auf 7,2 ein. Anschließend wird die Lösung auf eine Säule (20 cm Länge, 4,5 cm Durchmesser) aus DEAE-Cenllulose (DEAE-Sephadex A-25) gegeben, deren Chlorid-Form mit Tris/HCl-Puffer (pH 7,2; 0,05-m. an Tris) so lange gewaschen worden war, bis der Durchlauf ein pH von 7,2 hatte. Man eluiert mit diesem Puffer bis kein Porphobilinogen mehr von der Säule kommt, stellt das pH des Eluats mit verdünnter HCl auf 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 wenig H₂O suspendiert. Dann zersetzt man mit H₂S, zentrifugiert vom HgS ab und extrahiert dieses zweimal mit wenig H₂O. Die vereinigten Überstände werden im Vakuum schonend auf ca. 5 ml eingeeengt. Anschließend stellt man die Lösung mit verdünntem Ammoniak auf pH 4 ein. Dabei scheidet sich Porphobilinogen als Rohprodukt ab¹⁹.

Nach 12 Stdn. im Kühlschrank wird der Niederschlag abzentrifugiert. Im Zentrifugenbecher fügt man zur Auflösung des Porphobilinogens wenig 0,5-n. Ammoniak hinzu und zentrifugiert vom Ungelösten ab. Dieses wird nochmals mit wenig 0,5-n. Ammoniak extrahiert. Das pH der vereinigten ammoniakalischen Lösungen stellt man zur Fällung des Porphobilinogens mit Eisessig vorsichtig auf 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 Exsiccator über KOH. Ausbeute: 92 mg Porphobilinogen (21%).

Herrn Professor Dr. H. BREDERECK, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie danken wir für die Förderung unserer Arbeiten. Ferner sind wir Frau SYBILLE FRICKER, Frau GISELA SIEBKE und Fräulein KARIN LANDEBERGER für fleißige und gewissenhafte Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

¹⁵ K. BERNHAUER, E. BECHER u. G. WILHARM, Arch. Biochemistry **83**, 248 [1959].

¹⁶ D. MAUZERALL and S. GRANICK, J. biol. Chemistry **219**, 435 [1956].

¹⁷ W. H. ELLIOTT, Biochem. J. **74**, 90 [1960].

¹⁸ A. NEUBERGER and J. J. SCOTT, J. chem. Soc. [London] **1954**, 1820.

¹⁹ G. H. COOKSON and C. RIMINGTON, Biochem. J. **57**, 476 [1954].