Einbau von 5.6-Dimethyl-benzimidazol-[2-¹⁴C] in Vitamin B₁₂ durch *Streptomyces olivaceus*

Von FRIEDRICH WEYGAND*, HANS KLEBE und ACHIM TREBST

Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg

(Z. Naturforsch. 9b, 449–450 [1954]; eingegangen am 24. Mai 1954)

Streptomyces olivaceus verwertet 5.6-Dimethyl-benzimidazol zur Vitamin B₁₂-Synthese, obwohl die Produktion dadurch nicht erhöht wird. Dies ergab sich durch einen Versuch mit 5.6-Dimethyl-benzimidazol-[2-¹⁴C].

Die Gewinnung von Vitamin B₁₂ (Cobalamin) aus Kulturen verschiedener *Streptomyces*-Arten legte Versuche nahe, die Produktion dieses Vitamins durch Vorläufer (precursors) zu steigern. Woolley¹ berichtete in diesem Zusammenhang über eine gewisse Erhöhung der Vitamin B₁₂-Synthese bei *Bacillus megatherium* durch Zugabe von 4.5-Dimethyl-o-phenylendiamin zum Kulturmedium. Ferner stellten Dulaney und Williams² fest, daß o-Phenylendiamin sowie o-Xylidin, 3.4-Diamino-toluol und o-Nitranilin eine Erhöhung der „Vitamin B₁₂-Aktivität“ bei *Streptomyces griseus* um 100% und mehr unter bestimmten Bedingungen verursachen. Es erscheint möglich, daß aus den Basen o-Phenylendiamin und 3.4-Diamino-toluol neuartige Vitamin B₁₂-Verbindungen mit verändertem Nucleotidteil gebildet werden³.

1952 haben wir die Vitamin B₁₂-Bildung bei *Streptomyces olivaceus* NRRL-1125⁴ unter dem Einfluß verschiedener Zusätze geprüft und gefunden,

* Neue Anschrift: Chem. Inst. d. Universität Tübingen.

¹ D. W. Woolley, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 75, 745 [1950]; D. W. Woolley, E. Singer u. N. Smith, J. exp. Medicine 93, 13 [1951]; D. W. Woolley u. A. Pringle, J. biol. Chemistry 194, 729 [1952].

² E. L. Dulaney u. P. L. Williams, Mycologia 45, 345 [1953].

³ Vgl. hierzu die Versuche von J. E. Ford u. E. S. Holdsworth, Meeting Biochemical Society, London (16. Jan. 1954), und K. Bernhauer u. Mitarb. (Vortrag in Tübingen am 10. Mai 1954), wonach *E. coli*-Kulturen aus Faktor B (bzw. Faktor I nach W. Friedrich u. K. Bernhauer, Angew. Chem. 65, 627 [1953]), d. h. aus dem nucleotidfreien Cobalamin, neuartige Vitamine der B₁₂-Gruppe aufbauen, wenn geeignete Basen der Benzimidazol-Gruppe oder der Purin-Gruppe angeboten werden.

⁴ Wir danken dem Northern Regional Laboratory, Peoria, Ill., USA, bestens für die Überlassung dieses Stammes. H. H. Hall, R. G. Benedict, C. F. Wiesen, C. E. Smith u. R. W. Jackson, Appl. Microbiol. 1, 124 [1953]; 119th National Meeting, American Chemical Society, Cleveland, Ohio, 8. bis 12. April 1951.

daß bei der Züchtung in Schüttelkulturen in 50 ccm-Erlenmeyerkolben in einem Medium, bestehend aus 1,5% techn. Glucose, 4% Sojamehl, 0,05% Calciumcarbonat (nach dem Sterilisieren zugesetzt), 3 ppm Cobaltchlorid, 1 ppm Zinksulfat, 0,5 ppm Ferrosulfat und 0,35 ppm Mangansulfat, weder 5.6-Dimethyl-benzimidazol noch dessen N-β-d-Glucosid die Vitamin B₁₂-Bildung steigerten⁵. 5.6-Dimethyl-benzimidazol und 5.6-Dichlor-benzimidazol wirkten bei Konzentrationen über 200 γ/ccm hemmend auf das Pilzwachstum, während das 5.6-Dimethyl-benzimidazol-N-β-d-glucosid bis zu 400 γ/ccm geprüft keine Hemmung bewirkte⁶.

Obwohl also das 5.6-Dimethyl-benzimidazol die Vitamin B₁₂-Bildung durch *Str. olivaceus* nicht steigert, haben wir untersucht, ob es in das Molekül eingebaut wird, wenn es dem Pilz in dem oben aufgeführten Nährmedium angeboten wird. 3,2 mg 5.6-Dimethyl-benzimidazol-[2-¹⁴C]⁷ (Aktivität 0,83 mC/mMol) wurden einer 1 l-Rührkultur zugesetzt. Nach der Pilzzüchtung wurde unter KCN-Zusatz bei 100° aufgeschlossen und der Vitamin B₁₂-Gehalt mit der *E. coli*-Mutante 113-3 bestimmt⁸. Danach lagen 2,4 mg Vitamin B₁₂ vor. Zur Erleichterung der Auf-

⁵ Auch E. L. Dulaney u. P. L. Williams, Mycologia 45, 345 [1953], erzielten durch 5.6-Dimethyl-benzimidazol bei *Streptomyces griseus* keine Erhöhung der Vitamin B₁₂-Produktion. Hingegen soll nach Y. Sashiki, M. Nikata u. H. Sakao, Bull. chem. Soc. Japan 23, 247 [1950], Referat C. A. 46, 8210 [1952], eine Erhöhung der *L. lactis*-Aktivität um 100 bis 150% bei Zugabe von 5.6-Dimethyl-benzimidazol zum Kulturmedium von *Streptomyces* X-28 eintreten.

⁶ Eine Hemmwirkung von Benzimidazolen auf das Wachstum von *Sacch. cerevisiae* ist schon von D. W. Woolley et al. (J. biol. Chemistry 152, 225 [1944]) festgestellt worden.

⁷ Synthese aus 4.5-Dimethyl-1.2-diaminobenzol mit H¹⁴COOH (F. Weygand u. H. Simon, unveröffentlicht).

⁸ Verbesserte Bestimmungsmethode nach E. F. Möller, Heidelberg (unveröffentlicht).

arbeitung wurden 4,2 mg krist. Vitamin B₁₂ zugesetzt. Die Isolierung, die laufend durch Radioaktivitäts-Messungen und mikrobiologisch kontrolliert wurde, erfolgte auf folgende Weise:

1. Adsorption an Kohle bei p_H 3, Elution mit 75-proz. Aceton bei p_H 9 (Ammoniak).
2. Ausschüttelung des Dicyanid-Komplexes mit Benzylalkohol⁹; nach Chloroform-Zugabe Ausschüttelung mit Wasser.
3. Chromatographie an Aluminiumoxyd in wässriger Lösung.
4. Mehrfache papierchromatographische Reinigung mit *n*-Butanol-Wasser als Entwicklungsflüssigkeit (in Gegenwart von Cyanid).

Danach lagen 0,552 mg Cyano-cobalamin vor, von denen 0,20 mg aus der Kulturflüssigkeit stammten. Die Bestimmung erfolgte spektrophotometrisch. Das Absorptions-Spektrum stimmte mit dem von krist. Cyano-cobalamin überein. Die Radioaktivität wurde nach Aufbringung auf ein Aluminium-Meßschälchen von 1,8 cm² unter einem dünnwandigen Fensterzählrohr (2 mg/cm²) gemessen: 356 ± 10 Impulse/min. Durch Elution von Stoffen, die im Papier enthalten waren, betrug die Schichtdicke 8 mg/cm², wodurch

⁹ F. J. Wolf, U.S.P. 2530416 [1950]; R. J. Taylor u. G. O. Rudkin, Analytic. Chem. 24, 1155 [1952].

sich die Zahl der Impulse auf Grund der Absorption der weichen β -Strahlung von ¹⁴C auf etwa 1130 erhöht¹⁰. Da wir bei unserer Meßanordnung etwa 2% der Zerfälle messen, ergeben sich 56 000 Zerfälle/min in den aus dem Kulturmedium stammenden 0,2 mg Vitamin B₁₂.

Da 1 mMol (146 000 γ) unseres ursprünglich eingesetzten radioaktiven Dimethyl-benzimidazols $3,7 \cdot 10^7 \times 60 \times 0,83 = 1,84 \cdot 10^9$ Zerfälle/min zeigt, sind in den 0,2 mg Cobalamin $\frac{146.000 \times 56.000}{1,84 \cdot 10^9} = 4,4 \gamma$ Dimethyl-benzimidazol-¹⁴C enthalten. Nun beträgt der Anteil des Dimethyl-benzimidazols im Vitamin B₁₂ etwa 10%. Es entsprechen also die 4,4 γ radioaktives Dimethyl-benzimidazol 44 γ Vitamin B₁₂, d. h. von den 0,2 mg isolierten Cobalamins stammen etwa 20% (in bezug auf den Dimethyl-benzimidazol-Teil) aus dem zugesetzten radioaktiven Dimethyl-benzimidazol.

Von den in die 1 l-Kultur ursprünglich eingebrachten 3200 γ Dimethyl-benzimidazol-[2-¹⁴C] sind $\frac{4,4 \times 2,4}{0,2} = 53 \gamma$, das sind 1,6%, zur Vitamin B₁₂-Synthese verwertet worden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir bestens für die Unterstützung.

¹⁰ Vgl. Isotopic Carbon, J. Wiley & Sons, New York 1949, S. 317; Korrektur für Selbstabsorption in Wachs.

Stoffwechseluntersuchungen bei Mikroorganismen mit Hilfe radioaktiver Isotope V

Umwandlung von Xanthin und Hypoxanthin in Guanin und Adenin durch *Lactobacillus leichmannii* 313

VON FRIEDRICH WEYGAND, HANS KLEBE, ACHIM TREBST UND HELMUT SIMON

Aus den Chemischen Instituten der Universitäten Heidelberg und Tübingen

(Z. Naturforschg. 9b, 450—453 [1954]; eingegangen am 29. Mai 1954)

L. leichmannii 313 wandelt im Nährmedium angebotenes Xanthin oder Hypoxanthin in Guanin und Adenin um (Isolierung von Guanin und Adenin aus den Nucleinsäuren). Auf Grund der veränderten Umwandlungsraten nach Zusatz von nicht-radioaktivem Guanin und der früher¹ festgestellten Umwandlung von Guanin in Adenin, die nicht reversibel ist, wird ein Umwandlungsschema aufgestellt.

Mit Hilfe von Guanin-[8-¹⁴C] und Adenin-[¹⁴C] haben wir bewiesen, daß *Lactobacillus leichmannii* 313 Guanin in Adenin umwandelt. Die umgekehrte Reaktion ist aber nicht möglich¹. Um auszuschließen, daß der Pyrimidin-Ring bei dieser Umwandlung zwischendurch geöffnet wird, haben wir analoge Versuche mit Guanin-[2-¹⁴C] (Aktivität

0,83 mC/mMol) ausgeführt. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen¹ wurde das gleiche Ergebnis wie mit Guanin-[8-¹⁴C] erhalten. Der Versuch mit Guanin-[8-¹⁴C] wurde dabei wiederholt (s. Tab. 1).

Es ergibt sich, daß bei der Umwandlung angebo-

¹ F. Weygand, A. Wacker u. H. Dellweg, Z. Naturforschg. 7b, 156 [1952].