N-(*o*-Carboxyphenyl)-fructosylamin (Fructosylanthranilsäure), ein mögliches Zwischenprodukt der Tryptophan-Biosynthese in *Salmonella typhimurium*

Von F. LINGENS, H. HELLMANN und M. HILDINGER¹

Aus der biochemischen Arbeitsgruppe des chemischen Instituts der Universität Tübingen
(Z. Naturforschg. **13 b**, 727—729 [1958]; eingegangen am 31. Juli 1958)

Aus dem Kulturmedium auxotropher Mutanten von *Salmonella typhimurium*, deren genetischer Block innerhalb der Tryptophan-Biosynthese zwischen Anthranilsäure und Indol liegt, wurde ein im UV-Licht blau fluoreszierendes Akkumulat isoliert, das ein der Anthranilsäure ähnliches UV-Absorptionsspektrum zeigt und gleichzeitig charakteristische Reaktionen auf Fructose gibt. Die Prüfung auf *Amadori*-Verbindungen verlief negativ. Die Verbindung wird deshalb als *N*-(*o*-Carboxyphenyl)-fructosylamin angesprochen.

Tryptophan wird von Mikroorganismen über die Zwischenstufen Anthranilsäure und Indol gebildet². Der Übergang von Anthranilsäure zum Indol erfolgt bei Bakterien über den Phosphorsäureester des Indolyl-glycerins (I), das im Medium von Tryptophan-Mangelmutanten mit einem genetischen Block

zwischen Anthranilsäure und Indol in entphosphorylierter Form aufgefunden worden ist^{4,5}. Als Vorstufen dieses Esters sind die Phosphorsäureester von *N*-(*o*-Carboxyphenyl)-ribosylamin (II) und 1-(*o*-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-ribulose (III) angenommen worden^{5,6}.

Zur Prüfung dieser Vermutung wurde eine Reihe *S. typhimurium*- und *Escherichia coli*-Mutanten mit genetischem Block zwischen Anthranilsäure und Indol auf ihre Akkumulate untersucht. Einige dieser Mutanten gaben an das Medium Indolyl-3-glycerin ab, andere lieferten Anthranilsäure. Dabei zeigte es sich, daß als Kunstprodukt *N*-(*o*-Carboxyphenyl)-glucosylamin^{5,7} (Glucosyl-anthranilsäure) isoliert werden konnte, da die Bakterien unter Zusatz von Glucose als Kohlenstoffquelle gezüchtet worden waren. Um die Bildung dieses Kunstproduktes zu

vermeiden, wurden die *S. typhimurium*-Mutanten nur mit Natriumcitrat als Kohlenstoffquelle gezüchtet. *E. coli* kann bekanntlich nicht mit Citrat allein zum Wachstum gebracht werden; deshalb wurden die *E. coli*-Mutanten unter Zusatz von Glycerin bebrütet. Bisher konnten wir bei den untersuchten Mutanten die postulierten Vorprodukte II und III nicht nachweisen. Zu unserer Überraschung fanden wir in dem Medium zweier *S. typhimurium*-Mutanten eine andere Zuckerverbindung der Anthranilsäure. Nach Züchtung der Mutanten try-14 und -16

¹ Stipendiat des Svenska institutet, Stockholm.

² P. FIDES, Brit. J. exp. Pathol. **21**, 315 [1940]; **22**, 293 [1941]; E. E. SNELL, Arch. Biochemistry **2**, 389 [1943]; E. L. TATUM, D. M. BONNER u. G. W. BEADLE, Arch. Biochemistry **3**, 477 [1944].

³ C. YANOFSKY, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **20**, 438 [1956].

⁴ F. LINGENS u. H. HELLMANN, Angew. Chem. **69**, 97 [1957].

⁵ F. LINGENS, H. J. BURKHARDT, H. HELLMANN u. F. KAUDEWITZ, Z. Naturforschg. **12 b**, 493 [1957].

⁶ C. YANOFSKY, J. biol. Chemistry **223**, 171 [1956].

⁷ J. C. IRVINE u. R. GILMOUR, J. chem. Soc. [London] **95**, 1553 [1909].

Abb. 1. UV-Spektren der Akkumulate der Mutanten try-14 ○—○ und -16 ●—●. (Anthranilsäure Maxima 217,5, 247,5 und 375 mμ.)

unter den Bedingungen der optimalen Akkumulation⁸ wurde das Kulturmedium durch Zentrifugieren und Sterilfiltrieren von den Bakterien befreit. Das im UV-Licht fluoreszierende Filtrat wurde durch eine Säule mit Darco G 60 gegeben. Durch Eluieren mit Alkohol und Äther gelang die Isolierung einer Substanz, die ein der Anthranilsäure ähnliches UV-Spektrum (Abb. 1) zeigt und gleichzeitig positiven Nachweis auf Fructose liefert. Bei der papierchromatographischen Untersuchung zeigten sich unter der UV-Lampe zwei fluoreszierende Flecken, von denen einer der freien Anthranilsäure zuzuordnen ist, während der andere gleichzeitig charakteristische Reaktionen auf Anthranilsäure und Fructose gibt. Daneben war auf dem Papierchromatogramm regelmäßig noch freie Fructose nachweisbar. Danach muß es sich um eine labile Anthranilsäure-Fructose-Verbindung handeln. Fructosylamine zeigen im Vergleich zu Glycosylaminen eine besonders große Labilität⁹. Da auch die Prüfung auf Amadori-Verbindungen negativ verlief — Amadori-Verbindungen sind erfahrungsgemäß stabiler —, wird angenommen, daß es sich

bei dem isolierten Akkumulat um *N*-(*o*-Carboxyphenyl)-fructosylamin handelt.

Kürzlich gelang nun GIBSON und Mitarbb. der Nachweis von 1-(*o*-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose (III) bei zwei *Aerobacter aerogenes*-Mutanten¹⁰. Nimmt man an, daß III aus *N*-(*o*-Carboxyphenyl)-fructosylamin (IV) hervorgeht, so können drei Reaktionsschritte für diese Umwandlung postuliert werden. Formale sind eine Oxydation, eine Decarboxylierung und eine Oxydoreduktion an zwei benachbarten C-Atomen erforderlich (Voigt-Umlagerung¹¹, im speziellen Fall Amadori-Umlagerung). Bei einer primären Oxydation von IV würde zunächst ein Anthranilsäure-Derivat der 2-Ketogluconsäure (V) entstehen. Dieses könnte durch Decarboxylierung in IIa übergehen, das anschließend durch Amadori-Umlagerung das Endprodukt III ergäbe. Eine andere Möglichkeit bestünde in der Umlagerung von V zu einem Anthranilsäure-Derivat der 3-Keto-gluconsäure (VI) [2-(*o*-Carboxyphenylamino)-2-desoxy-3-ketogluconsäure], das als β -Ketosäure leicht durch Decarboxylierung in III überginge. Zur Veranschaulichung werden die diskutierten Reaktionswege nachstehend formelmäßig skizziert, wobei keine Entscheidung über die offene oder Ring-Struktur der Zucker und Konfiguration am glykosidischen C-Atom getroffen werden soll (s. Formeln S. 729).

Weniger wahrscheinlich ist eine primäre Voigt-Umlagerung von IV, deren Produkt bei nachfolgender Oxydation VI liefern würde.

Mit Hilfe von Enzymextrakten wird zur Zeit geprüft, ob eine Umwandlung von *N*-(*o*-Carboxyphenyl)-fructosylamin (IV) in 1-(*o*-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose (III) auf einem der postulierten Wege tatsächlich erfolgt.

Material und Methoden

Die Tryptophan-Mangelmutanten des Wildstammes LT 2 von *S. typhimurium* stellten uns freundlicherweise Herr Dr. KAUDEWITZ und Herr Dr. VIELMETTER, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, zur Verfügung. Die *E. coli*-Mutanten wurden durch UV-Induktion und Penicillin-Selektion isoliert¹².

Die *S. typhimurium*-Mutanten try-14 und try-16 wurden in einem modifizierten Minimalmedium¹³ gezüchtet,

⁸ F. LINGENS, H. J. BURKHARDT, H. HELLMANN u. F. KAUDEWITZ, Z. Naturforsch. **12b**, 497 [1957].

⁹ F. KNOTZ, Mh. Chem. **88**, 703 [1957].

¹⁰ F. W. E. GIBSON, C. H. DOY u. S. B. SEGALL, Nature [London] **181**, 549 [1958].

¹¹ K. VOIGT, J. prakt. Chem. [2] **34**, 2 [1886].

¹² F. LINGENS, R. NAGEL u. H. HELLMANN, unveröffentlicht.

¹³ F. KAUDEWITZ, Z. Naturforsch. **10b**, 562 [1955].

bei dem Glucose durch 4 g Natriumcitrat pro *l* Nährlösung ersetzt worden war. In mehreren Versuchsreihen kam ein Zusatz von 4 g Natriumcitrat und 4 g Natriumsuccinat pro *l* Nährlösung zur Anwendung. Dem Medium für die *E. coli*-Mutanten wurden pro *l* 2,5 ml Glycerin zugesetzt. Die Zugabe von Tryptophan betrug 1–2 γ pro ml. Flaschen mit je 500 ml Nährmedium wurden mit 10^4 Zellen pro ml beimpft, wobei die Zellen einer 12-Stdn.-Kultur in Nutrient Broth (Difco) entnommen worden waren. Nach 40-stdg. Bebrütung bei 37° wurde die Hauptmenge der Zellen durch Zentrifugieren entfernt und der Überstand durch ein Membranfilter filtriert. Das Filtrat gab man unmittelbar auf eine Säule mit Darco G-60. Die Säule wurde mit dest. Wasser nachgewaschen und anschließend mit Alkohol und Äther eluiert. Das im UV-Licht fluoreszierende Eluat wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur fast bis zur Trockne eingengt.

Der farblose bis gelbe Rückstand zeigte unter der UV-Lampe stark hellblaue Fluoreszenz. Bei der Papierchromatographie im System n-Butanol/3-proz. Ammoniak (1 : 1) traten im UV-Licht zwei Flecken mit den R_f -Werten 0,20–0,22 und 0,65–0,70 auf. Der Vergleich mit einer authentischen Probe ließ die Substanz mit dem niedrigeren R_f -Wert als Anthranilsäure erkennen. Mit Anilinphthalat gab der Substanzfleck mit dem höheren R_f -Wert 0,65–0,70 die charakteristische Reaktion auf Fructose; daneben konnte freie Fructose mit diesem Reagens nachgewiesen werden. Die unbekannte Substanz zeigte im Fließmittelsystem Methyläthylketon/Aceton/Wasser (3 : 1 : 0,6) einen R_f -Wert von 0,75

(Anthranilsäure $R_f=0,93$) und mit 80-proz. n-Propanol den R_f -Wert 0,40 (Anthranilsäure $R_f=0,78$ bis 0,80). Von der mit Alkohol aus dem Papier eluierten Substanz wurde ein UV-Spektrum aufgenommen (Abb. 1). Der Test auf diazotierbare Amine mit α -Naphthyl-äthylendiamin-dihydrochlorid nach BRATTON-MARSHALL¹⁴ war schwach positiv. Nach Besprühen des Chromatogramms mit Ehrlichs Reagens entstand eine dunkelgelbe Färbung des Substanzfleckes. Aus Papierchromatogrammen extrahiertes Material gab einen positiven Test auf Ketozucker mit Carbazol-Reagens¹⁵ und auf reduzierende Zucker mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid. Reaktionen auf Pentosen mit Phloroglucin¹⁶ und auf aromatische Hydroxy- und Dihydroxysäuren mit 2,6-Dibromchinon-chlorimid¹⁷ verliefen negativ. Mit Eisen-3-chlorid und Ninhydrin wurde ebenfalls keine positive Reaktion beobachtet. Nach Hydrolyse von extrahiertem Material mit 2-n. Salzsäure konnte papierchromatographisch neben freier Anthranilsäure nur noch Fructose mit Anilinphthalat und dem spezifischen Test auf Ketosen mit Anthron¹⁸ nachgewiesen werden. Spezifische Tests auf Amadori-Umlagerungsprodukte wie Reduktion von 2,6-Dichlorphenolindophenol in 0,1-n. alkalischem Milieu und Farbreaktion mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid in der Kälte verliefen negativ^{19, 20}.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit, den Farbenfabriken Bayer für die Überlassung von Chemikalien und Fräulein S. KERN für technische Hilfe.

¹⁴ A. C. BRATTON u. E. MARSHALL, J. biol. Chemistry **183**, 783 [1951].

¹⁵ Z. DISCHE u. E. BORENFREUND, J. biol. Chemistry **192**, 583 [1951].

¹⁶ Z. DISCHE u. E. BORENFREUND, Arch. Biochem. Biophysics **67**, 239 [1957].

¹⁷ H. G. BRAY, W. V. THORPE u. K. WHITE, Biochem. J. **46**, 271 [1950].

¹⁸ R. JOHANSON, Nature [London] **172**, 956 [1953].

¹⁹ J. E. HODGE, Advances Carbohydrate Chem. **10**, 169 [1955].

²⁰ W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER u. J. S. HARRISON, Nature [London] **166**, 444 [1950].