Except mitochondria, particles isolated from cells are very fragile. Therefore, the percentage of particulate 5-aminolevulinate dehydratase in non-pigmented tissues is surely higher than one third, as it was found after differential centrifugation. But until now there are no criteria to distinguish between soluble and particulate 5-aminolevulinate dehydratase on an enzyme level³. In addition it is a problem, whether the particles characterized by ALA dehydratase and porphobilinogenase are inactive enzyme compartments or active stations in the biosynthesis of porphyrins for organelles like mitochondria and microbodies which do not possess these enzymes. Although the early stages of porphyrin-synthesis take place in these particles, succinyl-CoA-synthetase is localized in the mitochondria. Considering the relative position on density gradients and the particulate 5-aminolevulinate dehydratase activity in gradients of *Rizinus endosperm*

porphyrin synthesizing particles can best be compared with the proplastids isolated and identified by morphological criteria by BREIDENBACH et al.¹³, although plastids from white tissue cultures of tobacco are different in morphology and do not show red fluorescence¹². Similarity of these two kinds of particles would mean that the ability to synthesize porphyrins is already present in proplastids and leucoplasts. Moreover 5-aminolevulinate dehydratase and porphobilinogenase could serve as marker enzymes for these organelles, hitherto not characterized by biochemical assays³⁰.

The author wishes to thank Prof. Dr. L. BERGMANN and Dr. B. GERHARDT for valuable discussion and Mrs. L. PABEL for technical assistance.

³⁰ J. T. O. KIRK and R. A. E. TILNEY-BASSETT, *The Plastids*, p. 63, W. H. Freeman and Company, London and San Francisco 1967.

Über den Katabolismus von Hamamelose [2-C-(Hydroxymethyl)-D-ribose]

I. Die Oxidation von Hamamelose durch *Pseudomonas*

On the Catabolism of Hamamelose [2-C-(hydroxymethyl)-D-ribose]

I. The oxidation of Hamamelose by *Pseudomonas*

A. THANBICHLER, H. GILCK und E. BECK

Botanisches Institut der Universität München, D-8000 München 19, Menzingerstraße 67

(Z. Naturforsch. 26 b, 912–915 [1971]; eingegangen am 7. Mai 1971, revidiert am 19. Mai 1971)

Free hamamelose [2-C-(hydroxymethyl)-D-ribose] occurs in almost all higher plants, but except a reduction to the corresponding sugar alcohol (hamamelitol), no metabolism of this branched chain hexose could be detected in plants until now. Therefore we tried to find microorganisms which would allow us to study the catabolism of hamamelose. A strain of *Pseudomonas* ("H 1"), showing dependence between growth and hamamelose concentration in the medium (Fig. 1), was isolated from soil on which *Primula clusiana* was grown (this plant contains large amounts of hamamelose and hamamelitol). However, this organism needs citrate besides hamamelose for growth.

When "H 1" was incubated in a phosphate buffer containing only ¹⁴C-labelled hamamelose, hamamelonic acid was the sole radioactive product formed (Tables 2, 3, 4).

As no further degradation of hamamelonic acid by "H 1" could be detected, we conclude that this organism uses hamamelose as a hydrogen source only. Thus it becomes reasonable that "H 1" needs an additional carbon source (citrate) for growth.

Untersuchungen von SELLMAIR¹ und VAN SCHERPENBERG et al.² haben es wahrscheinlich gemacht, daß freie Hamamelose [2-C-(hydroxymethyl)-D-Ribose] in allen höheren Pflanzen gebildet wird. In

den meisten der 560 untersuchten Arten ist jedoch der Pool dieser Hexose so klein, daß ein sicherer Nachweis nur mit der Isotopenmethode² möglich war. Primulaceen allerdings synthetisieren Hama-

Sonderdruckanforderungen an Dr. E. BECK, Botan. Institut d. Univ. D-8000 München 19, Menzinger Str. 67.

¹ J. SELLMAIR, Dissertation, TU München 1968.

² H. VAN SCHERPENBERG, W. GRÖBNER u. O. KANDLER, Festschr. K. MÖTHES — 65. Geburtstag, Jena 1965, S. 387.

melose im Licht in beträchtlichen Mengen; doch gelang es bisher nicht, irgend einen Umsatz dieser verzweigtkettigen Hexose außer einer Reduktion zum Zuckeralkohol (Hamamelit³) nachzuweisen⁴. Da auch Hamamelit außer einer äußerst langsam verlaufenden Reaktion mit Galaktose zu 1-O- α -D-Galaktopyranosyl-Hamamelit („Clusianose“⁵) keinen Umsatz erkennen läßt, suchten wir nach Mikroorganismen, um Aufschlüsse über einen Katabolismus von Hamamelose zu erhalten.

Die vorliegende Mitteilung berichtet über die Oxidation von Hamamelose zu Hamamelonsäure durch Bakterien der Gattung *Pseudomonas*.

Experimentelles

a) Isolierung von radioaktiver und nicht radioaktiver Hamamelose

Zur Gewinnung von Hamamelose- $U^{14}C$ wurden junge Blätter von *Primula clusiana* TAUSCH während 30 Min. in $^{14}CO_2$ -haltiger Luft belichtet und anschließend mit 70-proz. Äthanol ausgekocht. Aus dem Extrakt isolierten wir die radioaktive Hamamelose durch aufeinanderfolgende Papierchromatographie in den Fließmittelsystemen I, II und III (Tab. 2). Die für die Anzucht der Bakterien benötigte nicht radioaktive Hamamelose wurde nach der Methode von BECK et al.⁶ aus Hamamelisirinde isoliert.

b) Isolierung und Anzucht der Bakterien

Zur Isolierung von Hamamelose abbauenden Bakterien wurde 1 g Erde aus dem Wurzelbereich von *Primula clusiana** in 15 ml Nährlösung I aufgeschlämmt. Dieses Medium (pH 6,4) enthält pro l Wasser: Je 0,1 g KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; 0,4 g KNO_3 , 0,3 g KCl , 1,4 mg $FeCl_3$, 5 ml gesättigte EDTA-Lösung, 1 ml Hoaglands AZ-Lösung und 5 g Hamamelose. Der Kontrollansatz enthielt keine Hamamelose. Die Probe mit Hamamelose zeigte nach 2-tägiger Inkubation bei 30 °C eine deutliche Zunahme der Trübung gegenüber der Kontrolle. Die Bakterien ließen sich auf einem festen Nährboden (Nährlösung I + 2% Agar) weiterziehen. Mit Hilfe des Kochschen Plattenverdünnungs-Verfahrens wurde eine Reinkultur hergestellt. Danach ließ sich der Bakterienstamm in

einem Flüssigkeitsmedium nach BITTER et al.⁷ kultivieren. Dieses Medium (II) enthält pro l Wasser: je 5 g Na_2HPO_4 und $NaCl$ sowie 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 2 g Na-Citrat und 0,05 g Pepton; es wurden wieder 5 g Hamamelose pro l zugegeben.

c) Inkubation der Bakterien mit radioaktiver Hamamelose

Bakterien einer 22 Stdn. alten Kultur (500 ml Nährlösung II) wurden geerntet, zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mit 3 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,4) in den Hauptraum eines Warburg-Gefäßes gebracht. Im Mitteleinsatz des Gefäßes befand sich 3 N KOH zur Absorption von CO_2 .

Um die Organismen an Reservestoffen zu verarmen, wurde die Suspension zunächst ohne Hamamelose solange geschüttelt, bis ein merklicher Abfall des Sauerstoffverbrauchs eintrat (6 Stdn.). Dann wurde das Gefäß mit Sauerstoff gespült und 0,06 mM Hamamelose (0,21 μCi) in den Hauptraum gekippt.

d) Chemische Darstellung von Hamamelonsäure

500 mg Hamamelosesirup wurden nach der Methode von MOORE und LINK⁸ mit Hypojodit zur Aldonsäure oxidiert. Das Kaliumsalz der Hamamelonsäure kristallisierte aus Wasser/Methanol in Form farbloser Nadeln (Ausbeute 80%, Schmp. 172–173 °C).

$C_6H_{11}O_7K$ (234,3) **

Ber.	C 30,76	H 4,73	K 16,7,
Gef.	C 31,25	H 4,88	K 16,2.

Darstellung der freien Hamamelonsäure: 150 mg Kaliumhamamelonat wurden mit 1 ml DOWEX 50 WX 8 (100–200 mesh; H^+ -Form) 30 Min. lang bei 20 °C gerührt und das Filtrat bei +5 °C bis zur sirupösen Konsistenz eingengt. Beim Aufbewahren des Sirups bei –20 °C bildeten sich farblose Kristallplättchen, die mit Dioxan und Äther gewaschen und anschließend bei 60 °C im Vakuum getrocknet wurden. Schmp. 116 bis 118 °C.

$C_6H_{12}O_7$ (196,2)

Ber.	C 36,74	H 6,17,
Gef.	C 37,40	H 6,25.

Die CH-Werte zeigen, daß die freie Säure und nicht ein Lacton ($C_6H_{10}O_6$ (178,2) Ber. C 40,45 H 5,66) vorliegt.

³ J. SELLMAIR, E. BECK u. O. KANDLER, Z. Pflanzenphysiol. **59**, 70 [1968].

⁴ J. SELLMAIR u. O. KANDLER, Z. Pflanzenphysiol. **63**, 65 [1970].

⁵ E. BECK, Z. Pflanzenphysiol. **61**, 360 [1969].

⁶ E. BECK, J. SELLMAIR u. O. KANDLER, Z. Pflanzenphysiol. **58**, 434 [1968].

⁷ J. BITTER, F. WEIGMANN u. H. HABS, Münchener med. Wschr. **73**, 940 [1926].

* In Garten- und Komposterde konnten keine Hamamelose verwertenden Bakterien gefunden werden.

⁸ S. MOORE and K. P. LINK, J. Biol. Chemistry **205**, 293 [1940].

** Die gaschromatographische Bestimmung der C/H-Werte erfolgte am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München. Wir danken Herrn O. SELIGMANN für die Erstellung der Analysen. Die flammenphotometrische Bestimmung des K-Gehaltes wurde freundlicherweise von Herrn Prof. KÖSTER, Institut für Mineralogie der TU München mit einem Zeiss-Emissions-Flammenspektrometer PMQ II bei der Wellenlänge 766,5 nm durchgeführt.

e) *Hamamelonsäure-phenylhydrazid*

Um die synthetisierte Hamamelonsäure mit der von FREUDENBERG und BLÜMEL⁹ beschriebenen vergleichen zu können, synthetisierten wir das Phenylhydrazid nach der Methode dieser Autoren. Die Tab. 1 zeigt die Übereinstimmung der beiden Präparate.

	A	B
Schmp.	203–204 °C	202–203 °C
$[\alpha]_D^{22}$	+ 33,3 ± 3,4 ° (W)	+ 34,2 ± 3,3 ° (W)
Mischschmelzpunkt mit Gluconsäurephenylhydrazid	188–190 °C	188 °C

Tab. 1. Vergleich der Stoffwerte von synthetisiertem Hamamelonsäurephenylhydrazid (A) mit den in der Literatur⁹ angegebenen Daten (B).

Versuchsergebnisse

a) *Inkubation der Bakterien mit Hamamelose*

Die verwendeten Bakterien gehören zur Gattung *Pseudomonas*. Der Stamm erhielt die Bezeichnung „H 1“.

Da sich „H 1“ im flüssigen Medium nur dann ziehen läßt, wenn außer Hamamelose noch andere organische Substanzen enthalten sind (Citrät, Pepton) war zunächst zu prüfen, ob Hamamelose für diese Organismen Wuchsstoff oder Nährstoff ist.

Abb. 1. Abhängigkeit des Wachstums von *Pseudomonas* („H 1“) von der Hamamelosekonzentration im Medium II. Zur Messung wurden jeweils 36 Stdn. alte Kulturen verwendet.

Deshalb wurde das Wachstum von „H 1“ in Abhängigkeit von der Hamamelosekonzentration im Medium verfolgt. Abb. 1 zeigt die deutliche Korrelation

von Wachstum und Hamamelosekonzentration, auch in Bereichen, wie sie üblicherweise für Substrate benötigt werden, und die optimale Wuchsstoffkonzentrationen um ein Vielfaches übertreffen. Demnach ist Hamamelose für „H 1“ ein Nährstoff. Um die bei der Hamameloseverwertung durch „H 1“ anfallenden Abbauprodukte erfassen zu können, wurden an Reservestoffen verarmte Bakterien (s. experimentellen Teil) im Warburg-Gefäß 8,5 Stdn. lang (solange wurde ein erhöhter Sauerstoffverbrauch gemessen) mit radioaktiver Hamamelose (0,06 mM 0,21 μ Ci) inkubiert. Anschließend wurde abzentrifugiert und zweimal mit dest. Wasser gewaschen. Überstand und Waschwasser enthielten 98% der eingesetzten Radioaktivität. Dementsprechend fand sich im alkoholischen Extrakt der Zellen sowie im unlöslichen Rückstand (der nach der Methode von KALBERER und RUTSCHMANN¹⁰ aufgearbeitet wurde) keine Radioaktivität mehr; ebenso verlief die Prüfung auf gebildetes ¹⁴CO₂ negativ.

b) *Identifizierung der Abbauprodukte*

Um zu prüfen, ob bei der Inkubation der Bakterien mit ¹⁴C-Hamamelose flüchtige ungeladene oder saure Abbauprodukte gebildet worden waren, wurden aliquote Teile des bei der Zentrifugation erhaltenen Überstandes im alkalischen (pH 8,0) bzw. sauren Milieu (pH 3,5) je 3-mal am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht, wobei vor jeder Destillation etwas Wasser zugesetzt worden war. Da die im Rückstand verbliebene Radioaktivität jeweils der der Ausgangslösung gleich war, war das Vorliegen flüchtiger Substanzen auszuschließen.

Die radioaktive Lösung wurde nun papierelektrophoretisch sowie -chromatographisch weiter untersucht. Bei der Elektrophorese im alkalischen (Triäthylaminacetat-Puffer pH 9,7) und sauren (Ammoniumformiat-Puffer pH 3,7) Puffer ergaben sich jeweils 2 radioaktive Banden, von denen die stärkere (Fraktion I, 65% der eingesetzten Radioaktivität) ungeladen war, während die schwächere (Fraktion II, 35% des eingesetzten ¹⁴C) wie eine einbasische Säure wanderte. Die Papierchromatographie der Fraktion II im 3 Fließmittelsystemen ergab jeweils das Vorliegen zweier radioaktiver Verbindungen, die sich im wäßrigen Medium immer wieder ineinander umwandelten, also wohl 2 in einem Gleichgewicht

⁹ K. FREUDENBERG u. F. BLÜMEL, Liebigs Ann. Chem. **440**, 45 [1924].

¹⁰ F. KALBERER u. J. RUTSCHMANN, Helv. chim. Acta **44**, 1956 [1961].

Verbindung	R_{Glucose} -Wert im Fließmittelsystem		
	I	II	III
Hamamelonsäure	0,91	0,48	0,24
Hamamelonsäure-Lacton	1,89	1,45	1,83
Hamamelose	1,50	1,51	1,27
Hamamelit	1,54	1,55	1,20
Xylose	1,35	1,25	1,30
Ribose	1,67	1,56	1,50

Tab. 2. R_{Glucose} -Werte von Hamamelonsäure und Hamamelonsäurelacton im Vergleich mit denen anderer Zucker. Fließmittelsysteme: I: *n*-Butanol-Wasser (Lösung 1) : Propionsäure-Wasser (Lösung 2) = 1:1. Lösung 1: *n*-Butanol: Wasser = 750:50 (v/v). Lösung 2: Propionsäure: Wasser = 352:448 (v/v). II: 88% (w/w) Phenol : Wasser : Eisessig : 1 M Na_2EDTA = 480 : 160 : 10 : 1 (v/v). III: *n*-Butanol : Pyridin : Wasser : Eisessig = 60 : 40 : 30 : 3 (v/v). Es wurde auf Whatman-Papier Nr. 1 absteigend bei 25 °C chromatographiert. Radioautogramme der Chromatogramme stellten wir mit Agfa-Röntgenpapier her.

auf tretende Formen einer einzigen Substanz darstellen.

Eine davon erwies sich bei erneuter Papierelektrophorese als einbasische Säure, während die andere ungeladen war. Da beide Formen sowohl mit alk. Silbernitrat¹¹ wie auch mit Perjodat/Benzidin¹² reagierten, war anzunehmen, daß es sich um Anion und Lacton einer Oxsäure handelt. Da diese Verbindung aus Hamamelose gebildet worden war, lag die Vermutung nahe, daß es sich um Hamamelonsäure handelte.

Ein Vergleich der radioaktiven Säure mit synthetisierter Hamamelonsäure ergab bei Papierchromatographie (in 3 Fließmittelsystemen, s. Tab. 2) sowie bei Papierelektrophorese (in 2 verschiedenen Puffersystemen, s. Tab. 3) völlige Übereinstimmung, so-

Verbindung	$R_{\text{Pikrinsäure}}$ -Wert im Puffersystem	
	I	II
Hamamelonsäure	1,05	0,49
Hamamelonsäure-Lacton	0,00	0,00
Gluconsäure	1,06	0,65
Glucuronsäure	1,14	0,89

Tab. 3. $R_{\text{Pikrinsäure}}$ -Werte von Hamamelonsäure im Vergleich zu denen anderer Zuckersäuren bei Papierelektrophorese auf Whatmanpapier Nr. 1. Puffersysteme und Bedingungen: I: 0,1 M Triäthylaminacetat, pH 9,7; 55 V/cm, 8 °C, 60 Minuten. II: 0,2 M Ammoniumformiat, pH 3,7; 27 V/cm, 8 °C, 90 Minuten.

wohl in den Laufstrecken von Anion und Lacton, als auch in der Aufspaltung in die beiden Formen.

Übereinstimmung ergab sich ferner bei der Gaschromatographie der Trimethylsilyl-Derivate (Tab. 4).

Hamamelonsäurelacton	26,2
Hamamelonsäure	33,5
Gluconsäure-1.4-lacton	29,8
Gluconsäure	33,8
Hamamelose	27,1; 28,5; 29,5

Tab. 4. Retentionszeiten (min) der Trimethylsilyl-Derivate von Hamamelonsäurelacton und Hamamelonsäure im Vergleich mit denen entsprechender Derivate von Gluconsäure-1.4-lacton, Gluconsäure und Hamamelose bei Gaschromatographie (Packard, Modell 7461/564) an 4% GE SE 54 auf Gaschrom Q (60–80 mesh). Bedingungen: Säulenlänge: 6ft; Temperaturprogramm: Start 120° (10 min), anschließend Temperatursteigerung von 3 °C/min bis 210 °C. Carriergas: N_2 . Die Verbindungen wurden mit *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoracetamid gelöst und trimethylsilyliert.

Schließlich konnte die Identität noch durch Kokristallisation der Kaliumsalze bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität bestätigt werden. Die papierchromatographische Analyse der Fraktion I des Überstandes ergab, daß es sich nur um ein Gemisch aus Hamamelonsäurelacton und nicht umgesetzter Hamamelose handelt.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß bei der Inkubation des Pseudomonasstammes „H 1“ mit Hamamelose Hamamelonsäure als einziges Produkt auftritt. Demnach können diese Organismen Hamamelose nur als Wasserstoff-, nicht aber als Kohlenstoffquelle benutzen. Dieser Befund erklärt, daß „H 1“ zum Wachstum außer Hamamelose eine weitere organische Substanz, nämlich Citrat als Kohlenstoffquelle benötigt.

Da die Bakterien aus der Erde des Wurzelbereichs von *Primula clusiana* isoliert worden waren, ist anzunehmen, daß bei der Zersetzung der abgeworfenen hamamelosehaltigen Primelblätter durch Mikroorganismen ebenfalls Hamamelonsäure auftritt. Sie ist demnach als in der Natur vorkommende Verbindung anzusehen.

Wir danken Herrn Prof. Dr. O. KANDLER, Botanisches Institut der Universität München, für fruchtbare Diskussionen und Ratschläge. Die Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe des Bundesministeriums für Bildung und Wissenschaft unterstützt.

¹¹ W. TREVELYAN, D. D. PROCTER u. J. S. HARRISON, Nature [London] 166, 444 [1950].

¹² J. A. CIFONELLI u. F. SMITH, Analytic. Chem. 26, 1132 [1954].