

Löslichkeit des 3.4-Benzpyrens in wäßrigen Proteinlösungen

Von JOACHIM STAUFF und GÜNTER RESKE

Aus dem Institut für physikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt
(Z. Naturforsch. 15 b, 578—584 [1960]; eingegangen am 6. Februar 1960)

Durch fluoreszenz-spektrographische Intensitätsmessungen mit einem aus Laboratoriumsmitteln gebauten, einfachen Fluoreszenzspektrometer wurde die Löslichkeit des carcinogenen Kohlenwasserstoffs 3.4-Benzpyren in verdünnten, wäßrigen Lösungen von β -Lactoglobulin und Milchsäure-Dehydrogenase bestimmt. Die molare Lösungsvermittlung der Proteine für 3.4-Benzpyren ist erheblich größer als die des Koffeins. Die Fluoreszenz des 3.4-Benzpyrens wird in den Proteinlösungen nicht durch molekularen Sauerstoff gelöscht. Das beobachtete Spektrum gleicht demjenigen alkoholischer Lösungen von 3.4-Benzpyren ohne Konzentrationslöschung.

Zur Untersuchung des Einflusses krebserregender Kohlenwasserstoffe auf das Verhalten von Proteinen in Lösungen war es notwendig, die Löslichkeit und — wenn möglich — den Zustand des 3.4-Benzpyrens in wäßrigen Proteinlösungen zu ermitteln.

Über die Löslichkeit von carcinogenen Kohlenwasserstoffen in Serum wurde bereits von verschiedenen Autoren berichtet. Hier ist vor allem die Arbeit von LORENZ und ANDERVONT¹ zu erwähnen, in der die Löslichkeit von 1.2.5.6-Dibenzanthracen in Pferde-, Hühner- und Hundeserum mit 1, 5, 50 und 140 mg/l angegeben wird. BROCK, DRUCKREY und HAMPERL² haben gezeigt, daß 3.4-Benzpyren in Körperflüssigkeiten und lebenden Geweben molekular gelöst wird. Das Lösungsvermögen wird im wesentlichen auf den Lipoidgehalt und die Anwesenheit lösungsvermittelnder Substanzen zurückgeführt. Durch papierelektrophoretische Untersuchungen kamen WUNDERLY und PEZOLD³ zu dem Schluß, daß am Lösungsvorgang 3.4-Benzpyren — Blutserum hauptsächlich die lipidtragenden α_2 und β -Globuline beteiligt sind. In den letzten Jahren konnten FALK, MILLER und KOTIN^{4, 5} zeigen, daß 3.4-Benzpyren aus Rußteilchen durch steriles menschliches Plasma eluiert wird und daß Milch aus Wachs, dem 3.4-Benzpyren beigemischt war, den carcinogenen Kohlenwasserstoff zu eluieren vermag, ohne gleichzeitig das Wachs aufzulösen.

In reinem Wasser oder Salzlösungen sind Kohlenwasserstoffe meist extrem unlöslich und lassen

sich darin nur durch Zusatz gewisser lösungsvermittelnder Substanzen in nennenswertem Ausmaß zerteilen. Ob in solchen Fällen eine niedermolekulare oder kolloide Zerteilung entsteht, ist ungewiß, denn eine eindeutige Entscheidung ist wegen der sehr niedrigen Konzentration der zerteilten Substanz durch die gebräuchlichen Methoden der Bestimmung des Partikel-Mol.-Gew. nicht ohne weiteres möglich. Beim 3.4-Benzpyren lassen sich jedoch die Mengen der dispergierten Substanz leicht durch die Aufnahme des Fluoreszenzspektrums der Zerteilung bestimmen⁶⁻⁹, wobei die Empfindlichkeit durch Verwendung geeigneter intensiver Lichtquellen und hochempfindlicher Strahlungsempfänger (Sekundärelektronen-Vervielfacher) sehr weit gesteigert werden kann. Der Charakter des Fluoreszenzspektrums läßt unter Umständen auch auf die Art des Lösungszustandes schließen.

Da uns keines der heute gebräuchlichen empfindlichen Fluoreszenzspektrophotometer zur Verfügung stand, haben wir ein Spektrometer aus Laboratoriumsmitteln unter Verwendung eines Schottschen Interferenz-Verlauffilters gebaut. Die spektrale Auflösung eines solchen Gerätes ist wegen der Halbwertsbreite des Verlauffilters nur gering, andererseits ist es wegen dessen großer Durchlässigkeit (35%) sehr lichtstark.

Um Vergleiche zu haben, wurden Messungen in alkoholischen Lösungen, in wäßrigen, gepufferten Lösungen von β -Lactoglobulin und Milchsäure-

¹ E. LORENZ u. H. B. ANDERVONT, Amer. J. Cancer **26**, 783 [1936].

² N. BROCK, H. DRUCKREY u. H. HAMPEL, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **189**, 709 [1938].

³ C. H. WUNDERLY u. F. A. PEZOLD, Naturwissenschaften **39**, 493 [1952].

⁴ H. L. FALK, P. KOTIN u. A. MILLER, Nature [London] **183**, 1184 [1959].

⁵ H. L. FALK, A. MILLER u. P. KOTIN, Science [Washington] **127**, 474 [1958].

⁶ F. BANDOW, Z. physikal. Chem. **196**, 329 [1951].

⁷ P. ERWALL, K. K. SETÄLÄ u. L. SJÖBLÖM, Acta chem. scand. **5**, 175 [1951].

⁸ TH. FÖRSTER, Fluoreszenz organischer Verbindungen. Verlag Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1951.

⁹ G. MIESCHER, F. ALMÄSY u. K. KLÄUI, Biochem. Z. **287**, 189 [1936].

Dehydrogenase sowie von Koffein gemacht. Außerdem wurde das Spektrum grober Dispersionen der festen Substanz aufgenommen.

Wegen der starken Sauerstofflöschung der Fluoreszenz des 3,4-Benzpyrens mußten die Versuche z. T. unter Luftausschluß und in einer Stickstoffatmosphäre vorgenommen werden.

Experimenteller Teil

Apparatur

Die zu untersuchenden Lösungen wurden mit dem gefilterten Licht einer Quecksilberhochdrucklampe (Typ HQV 300, Osram und St 40, Quarzlampengesellschaft Hanau) bestrahlt. Die Küvette aus Quarzglas hatte rechteckigen Querschnitt. Das erregende Licht wurde durch ein System aus drei Blenden, daß nur die Lösung in der Küvette, nicht aber Wände der Küvette getroffen wurden, die in der Beobachtungsrichtung lagen. Beobachtet wurde im rechten Winkel zur Einstrahlungsrichtung.

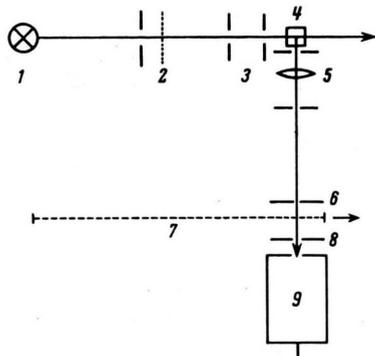


Abb. 1. Skizze des Fluoreszenzspektrometers. 1 Lampe, 2 Filter, 3 Blenden, 4 Küvette, 5 Achromat mit Blendenpaar, 6 Spalt, 7 Verlauffilter, 8 Verschluß, 9 EMI-Multiplier.

Die Skizze der Abb. 1 gibt den prinzipiellen Aufbau des Gerätes wieder. Das Fluoreszenzlicht fiel durch ein Blendenpaar und eine Linse, die so berechnet waren, daß kein vom Vorder- oder Rückfenster der Küvette reflektiertes Licht durchgelassen werden konnte. Die Linse fokussiert das Fluoreszenzlicht in einem 1 mm breiten Spalt, hinter dem sich das Interferenz-Verlauffilter des Typs AsI (Schott & Gen., Mainz) befindet. Das Interferenzfilter kann durch einen Synchronmotor am Spalt vorbei bewegt werden, so daß je nach seiner Stellung eine andere Wellenlänge des Bereichs zwischen 370 und 700 $m\mu$ durchgelassen wird. Die Messung der Intensität des durchgelassenen Fluoreszenzlichtes besorgt ein Sekundärelektronen-Vervielfacher (6094, E.M.I., Electronics Ltd.).

Bei der Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums wird der der Fluoreszenzintensität proportionale Strom des Sekundärelektronen-Vervielfachers von einem Registriergerät (Philipps-Kompensationsschreiber) aufgezeichnet; Papiervorschub und Durchlauf des Interferenzfilters sind synchron gekoppelt. Der Vorschub kann auf diese Weise in Einheiten der Lichtwellenlänge geeicht werden, so daß das Schreibgerät direkt das Fluoreszenzspektrum aufzeichnet (meist wurde 1 mm Papiervorschub = 1 mm Filtervorschub gewählt).

Das Verlauffilter läßt natürlich in einer Strecke von 1 mm (Spaltbreite) kein monochromatisches Licht durch, sondern einen Spektralbereich, der nach dem Datenblatt von Schott & Gen. etwa 8–12 $m\mu$ betragen soll. Aus diesem Grunde ist die Auflösung des Spektrums in feinere Banden nicht zu erwarten, brauchte aber auch nicht angestrebt zu werden, da die Kenntnis des ungefähren Verlaufs für die zu beantwortenden Fragen ausreichend war.

Die Apparatur wurde mit Chinin-Sulfat-Lösungen geeicht. Als Vergleich diente ein Standardspektrum, das uns von Herrn Dr. LIPPERT, Stuttgart, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Herstellung der Lösungen

Das kristalline 3,4-Benzpyren* wurde zunächst trocken in einer geschlossenen Glaskugelmühle staubfein gemahlen und zur Herstellung einer Suspension in Phosphatpuffer nach Vermischung mit der Pufferlösung noch einige Std. naß weitergemahlen. Die Pufferlösung bestand aus 560 Tln. einer Lösung mit 8,19 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ im l und 440 Tln. einer Lösung mit 6,262 g KH_2PO_4 im l ; $p\text{H}$ 7,0; Ionenstärke = 0,1. Zur Lösung wurde tridest. Wasser verwendet. Alle Lösungen wurden in diesem Puffer angesetzt.

Bei jedem Versuch wurden der Puffer und die Kohlenwasserstoff-Suspension durch Erhitzen auf 100 °C keimfrei gemacht.

Proteine, Koffein usw. wurden im Meßkolben eingewogen und nach Auflösung in einer ausreichenden Menge Pufferlösung mit einer zur Einstellung des Lösungsgleichgewichts binnen zwei Std. ausreichenden Menge Benzpyrensuspension versetzt. Schließlich wurde auf das gewünschte Volumen aufgefüllt**. Die Suspensionen wurden zwei Std. stehen gelassen und von Zeit zu Zeit umgeschüttelt. Zur Befreiung von den überschüssigen festen Kohlenwasserstoff-Partikeln wurden die Mischungen 20 min bei 18 000 U/min zentrifugiert. Die vom abgesetzten Kohlenwasserstoff dekantierten Lösungen wurden für die Fluoreszenzmessung verwendet. Einige noch suspendierte Partikel stören die Messung nicht.

Filtration erwies sich als ungeeignet, da die Proteine durch mechanische Denaturierung in der Glasfritte ver-

bestimmt. Sie ist um so größere, je größer die Gesamtoberfläche der suspendierten Partikel ist, d. h. bei einheitlicher Durchschnittspartikelgröße wächst sie mit der Menge der zugesetzten Suspension.

* Das Präparat wurde von der Gesellschaft für Teerverwertung m.b.H., Duisburg-Meiderich, geliefert.

** Die Geschwindigkeit der Einstellung des Lösungsgleichgewichts wurde in einem gesonderten Versuch mit sehr kleinen Mengen von Benzpyrensuspension halbquantitativ

ändert wurden. Der Fehler betrug bei einer Filtration durch die Fritte G 5 (Schott & Gen.) etwa 50%, bei der Fritte G 4 10 bis 20%.

Standard und Vergleichsmessungen

Als Standard zur Kontrolle der Wellenlängen, Intensitäten und der Lampenstabilität wurde nach LIPPERT¹⁰ eine 10^{-5} -m. Lösung von Chininsulfat in 0,1-n. H_2SO_4 verwendet. Alle Fluoreszenzintensitäten wurden auf das Standardmaximum von $465\text{ m}\mu$ bezogen.

Die Vergleichsmessungen des 3,4-Benzpyrens wurden in Lösungen von 95-proz. Äthylalkohol ausgeführt. Es wurde eine Ausgangslösung von 5 mg 3,4-Benzpyren in 25 ml Alkohol ($8,4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) hergestellt, woraus durch fortgesetztes Aliquotieren und Verdünnen Lösungen mit Konzentrationen bis herab auf $5,4 \cdot 10^{-8}$ Mol 3,4-Benzpyren/l bereit wurden.

Messungen unter Sauerstoffausschluß

Für die Messungen unter Sauerstoffausschluß wurde eine verschließbare Quarzküvette mit zwei angeschmolzenen Hähnen verwendet. Die Luft wurde durch Reinststickstoff verdrängt, der noch durch Überleiten über an Kieselgur adsorbiertes, elementares Kupfer in feinsten Verteilung bei 200°C nach MAYER und RONGE¹¹ von den noch vorhandenen O_2 -Spuren befreit worden war.

Die Möglichkeit, daß z. B. an Proteinmolekülen gebundenes 3,4-Benzpyren mit Luftsauerstoff unter Bildung störender Folgeprodukte reagiert, konnte von vornherein nicht ausgeschlossen werden. Falls die Umwandlungsprodukte des Benzpyrens nicht in einem vom Sauerstoffpartialdruck abhängigen Gleichgewicht stehen, hätte eine solche Reaktion eine irreversible Sauerstofflöschung der Benzpyrenfluoreszenz zur Folge. Deshalb mußten Versuche gemacht werden, bei welchen die Benzpyrensuspension und die Proteinlösung erst nach Entfernung des gelösten Luftsauerstoffes miteinander vermischt wurden. Hierzu wurde eine in Abb. 2 dargestellte Apparatur verwendet.

Zuerst wurde in Rohr 1 bei offenem Hahn 2 durch Hahn 1 die 3,4-Benzpyrensuspension durch 3-stdg. Einleiten von Reinststickstoff sauerstofffrei geblasen. Dann wurde Hahn 2 geschlossen und Rohr 2 auf den Hahn 3 aufgesetzt. Im Rohr 2 wurde anschließend die zu untersuchende Lösung — etwa eine Proteinlösung — durch langsames Einleiten von Reinststickstoff durch Hahn 3 ebenfalls vom Sauerstoff befreit. Durch das entweichende Gas wurde gleichzeitig die hinter der Fritte G 3 angeschlossene Quarzküvette luftfrei geblasen. Außerdem wurden aus der Küvette noch durch mehrfaches abwechselndes Durchspülen mit Reinststickstoff und Evakuieren mittels der Hähne 5 und 6 bei ge-

schlossenem Hahn 4 die letzten Reste von Sauerstoff entfernt. Die Komponenten wurden bei offenem Hahn 2 gemischt und die übliche Zeit stehen gelassen. Die Proteinkonzentration im Gemisch läßt sich aus den vorgegebenen Konzentrationen und Volumen leicht errechnen. Nach Einstellung des Lösungsgleichgewichts — während der ganzen Zeit strömte unter leichtem Überdruck Stickstoff durch die Apparatur, um das Eindringen von

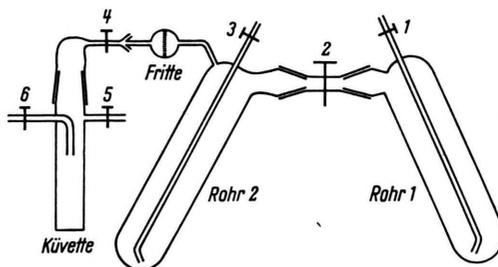


Abb. 2. Apparatur zur Darstellung sauerstofffreier 3,4-Benzpyren-Proteinlösungen.

Luft zu verhindern — wurde ein Teil der Lösung über die Fritte in die Küvette hineingesaugt und ihr Fluoreszenzspektrum gemessen. Dabei mußten durch Filtration entstandene Veränderungen (s. o.) in Kauf genommen werden; sie waren aber in diesem Zusammenhang ohne Bedeutung.

Ergebnisse

a) Fluoreszenzspektren

Infolge der geringen Dispersion des Verlauffilters erscheint das bandenreiche Fluoreszenzspektrum des 3,4-Benzpyrens (BANDOW⁶; MIESCHER, ALMASY und KLÄUI⁹ u. a.) stark vereinfacht (s. Abb. 3). Bei der

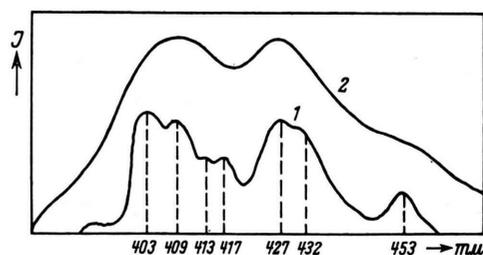


Abb. 3. 3,4-Benzpyren-Fluoreszenzspektren, nach MIESCHER et al. 1, mit Verlauffilter 2.

Lösung des Kohlenwasserstoffs in 95-proz. Alkohol erscheint bei dieser Anordnung ein Maximum bei $410\text{ m}\mu$, ein gleich großes bei $427\text{ m}\mu$ und ein

¹⁰ E. LIPPERT, Stuttgart: Fluoreszenzspektroskopische Intensitätsmessungen. Vortrag auf der Tagung der Bunsengesellschaft, Freiburg 1957.

¹¹ F. R. MAYER u. G. RONGE, Angew. Chem. **52**, 637 [1939].

schwächeres, verdecktes, nur noch an einem Wendepunkt der Kurve zu erkennendes Maximum bei $454\text{ m}\mu$. Bei $420\text{ m}\mu$ tritt ein ausgeprägtes Minimum auf. (Vgl. Abb. 3.) Die Fluoreszenz des 3,4-Benzpyrens unterliegt der Konzentrationslöschung, die jedoch den kürzerwelligen Anteil des Spektrums stärker beeinflusst als den längerwelligen. Aus diesem Grunde hat das Spektrum bei höheren Konzentrationen

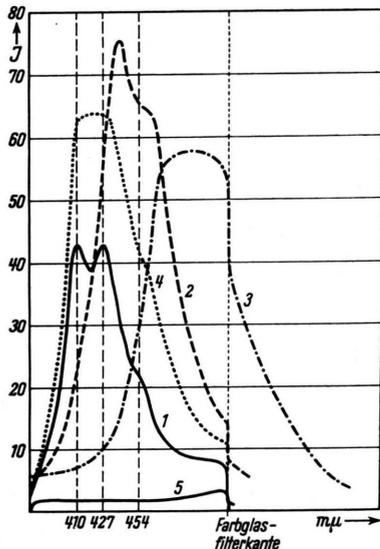


Abb. 4. 3,4-Benzpyren-Fluoreszenzspektren. 1: $5,38 \cdot 10^{-7}$ Mol 3,4-Benzpyren/l Äth.; 2: $8,4 \cdot 10^{-4}$ Mol 3,4-Benzpyren/l Äth. 3: 3,4-Benzpyren-Suspension, qual.; 4: 3,4-Benzpyren in Koffeinelösung, 2,5 g/l, $I \times 8$, s. Tab. 1; 5: Lösungsmittel; I in Skalenteilen, s. Tab. 1.

nen ein anderes Aussehen als bei niederen, was durch den Vergleich der Kurven 1 und 2 der Abb. 4 leicht zu erkennen ist.

Eine Suspension von festem 3,4-Benzpyren in Wasser (vgl. WEIGERT und MOTTRAM¹²) fluoresziert mit einer spektralen Intensitätsverteilung, wie sie Kurve 3 der Abb. 4 zeigt. Der Unterschied zum Spektrum der molekulargelösten Substanz ist so deutlich, daß auf diese Weise zwischen den beiden Verteilungszuständen unterschieden werden kann.

Wellenlängen und Intensitätsverhältnisse der Banden in den Spektren des 3,4-Benzpyrens in einer Proteinlösung und in alkoholischer Lösung unterscheiden sich nicht, so daß in beiden Fällen der gleiche Lösungszustand vorzuliegen scheint.

Löst man hingegen den Kohlenwasserstoff in wäßriger Koffeinelösung (WEIL-MALHERBE¹³; EKWALL,

¹² F. WEIGERT u. J. C. MOTTRAM, Nature [London] 145, 895 [1940].

* Vgl. dazu BAUMANN¹⁰, WEIL-MALHERBE u. WEISS¹¹.

SETÄLÄ und SJÖBLOM⁷), so fehlt eigenartigerweise das Minimum bei $420\text{ m}\mu$, das in alkoholischen und Proteinlösungen auftritt.

Eichung

Zur Konzentrationsmessung wurde die Apparatur mit alkoholischen Lösungen von 3,4-Benzpyren geeicht. Die Ergebnisse der Messungen unter Luft und Stickstoff sind in der Abb. 5 dargestellt. Bei 750 mm Hg Luftdruck und 20°C wurde eine Sauerstofflöschung von 60% beobachtet. Sie läßt die Intensitätsverhältnisse der Banden unverändert*. Die Nachweisgrenze der Apparatur liegt bei Verwendung der Lampe HQV 300 bei

$$5 \cdot 10^{-12} \text{ Mol 3,4-Bp/ml} = 10^{-9} \text{ g 3,4-Bp/ml.}$$

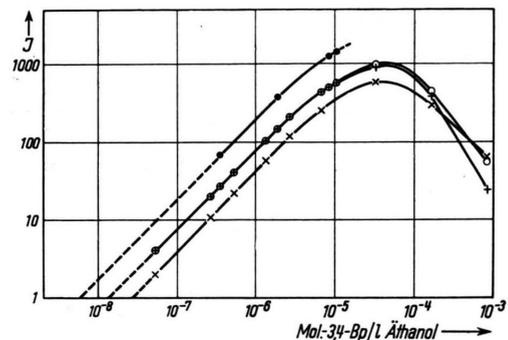


Abb. 5. Konzentrationsabhängigkeit und Intensitätsverteilung der 3,4-Benzpyren-Fluoreszenz in alkoholischen Lösungen. + $410\text{ m}\mu$, o $427\text{ m}\mu$, x $454\text{ m}\mu$ unter Luft, ● $410\text{ m}\mu$ unter N_2 -Atmosphäre; I in Skalenteilen, s. Tab. 1.

Die Intensität der Fluoreszenzbanden ist linear von der Konzentration abhängig bis herauf zu

$$3 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l} = 3 \cdot 10^{-9} \text{ Mol/ml} = 7,5 \cdot 10^{-7} \text{ g/ml.}$$

Dort beginnt die Intensität von der linearen Konzentrationsabhängigkeit wegen der Konzentrationslöschung abzuweichen.

Gleichzeitig mit der Abnahme der Intensität mit steigender Konzentration verschieben sich die Intensitätsverhältnisse der Fluoreszenzbanden zugunsten der Banden mit größerer Wellenlänge (vgl. Abb. 5), s. FÖRSTER⁸; MIESCHER, ALMASY und KLÄUI⁹.

Ergebnisse der Konzentrationsmessungen

Die Ergebnisse der Messungen an β -Lactoglobulin, Milchsäure-Dehydrogenase und einigen anderen Substanzen sind in der Tab. 1 zusammengestellt. Alle Lösungen wurden in Phosphatpuffer $p_{\text{H}} 7$ und der Ionenstärke 0,1 angesetzt. Die angegebenen Werte stellen die Differenzen zwischen den gemessenen

Solvatisierender Stoff	Konzentration des solv. Stoffes [g/ml · 10 ⁻³]	Intens. der Fluoresz. bei 410 m μ in Skalentr. (1 Sktl. = 1/435 d. Int. d. St.-Maximums)	Berechn. Bp-Konz. [g/ml]	Bp-Konz. pro Mol solv. Sbstz. [Mol]
β -Lactoglobulin (Pentex Inc., Kankakee, Ill.)	0,2	15,5	$9,8 \times 10^{-8}$	$15,6 \times 10^{-3}$
	0,4	31		
	1,0	76 (MW)		
	2,0	140,5 (MW)		
Milchsäuredehydrogenase (MDH)*	0,5	4	$1,1 \times 10^{-8}$	$5,4 \times 10^{-3}$
	1,0	8		
	2,0	16		
Koffein DAB6 (Merck)	2,5	505	$6,5 \times 10^{-7}$	$0,2 \times 10^{-3}$
Desoxyribonucleinsäure MG 2—400.000 (Roth)	1,0	+		
Adenosin (Merck)	2,0	+		
Cystein (Merck)	1,0	—		

Tab. 1. Löslichkeiten des 3.4-Benzpyrens.

* Präparat von Dr. PFLIEDERER, Biochem. Abt. des Inst. f. org. Chemie, Universität Frankfurt/M.

nen Werten und den Werten der entsprechenden Blindversuche ohne 3.4-Benzpyren dar. Bei den Lösungen in β -Lactoglobulin, Milchsäure-Dehydrogenase und Koffein (vgl. WEIL-MALHERBE¹³) wurde keine Sauerstofflöschung festgestellt. Auf eine mögliche irreversible Sauerstofflöschung wurde bei der Milchsäure-Dehydrogenase gesondert geprüft. Es konnten innerhalb der Grenzen der Meßgenauigkeit keine Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten zwischen sauerstofffreien und belüfteten Proben beobachtet werden. Die Konzentrationsangaben sind daher auf die Werte der alkoholischen Lösungen unter Stickstoff bezogen. Bei Desoxyribonucleinsäure, Adenosin und Cystein wurde die Sauerstofflöschung nicht untersucht.

Zur Übersicht sind die Abhängigkeiten der Fluoreszenzintensität von der Proteinkonzentration in Abb. 6 dargestellt. Für beide untersuchte Proteine resultiert innerhalb der Fehlergrenzen eine Konstanz des Molverhältnisses. Es gilt

3.4-Benzpyren : β -Lactoglobulin = 1 : 64 (± 3)
und

3.4-Benzpyren : MDH = 1 : 185 (± 9).

Bei der Berechnung wurde für β -Lactoglobulin das Mol.-Gew. 40 000, für die MDH das Mol.-Gew. 125 000 eingesetzt.

¹³ H. WEIL-MALHERBE u. J. WEISS, J. chem. Soc. [London] 1944, 541.

Während die Fluoreszenzspektren des 3.4-Benzpyrens in Proteinlösung und in alkoholischer Lösung übereinstimmen, wurde in Koffeinlösung eine andere spektrale Intensitätsverteilung beobachtet

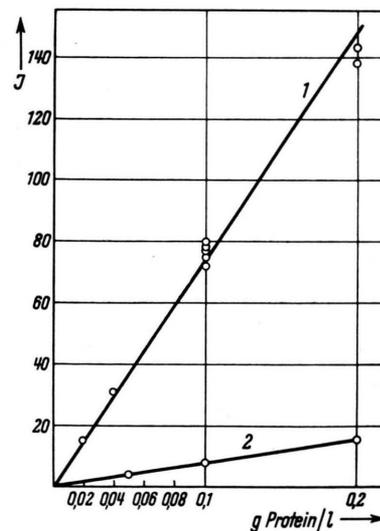


Abb. 6. Konzentrationsabhängigkeit der Intensität der 3.4-Benzpyren-Fluoreszenz (410 m μ) in Proteinlösungen.
I s. Tab. 1.

(vgl. Kurve 4, Abb. 4). Der durch Vergleich mit der Eichkurve gewonnene Wert für die Löslichkeit in Koffeinlösung ist daher unsicher.

Die Ungenauigkeit des direkten Intensitätsvergleichs bei Koffeinlösung kann durch Vergleich mit den in einer Arbeit von WEIL-MALHERBE¹⁴ mitgeteilten Ergebnissen bestimmt werden. WEIL-MALHERBE extrahierte Benzpyren-Koffeinlösungen verschiedener Konzentrationen mit Petroläther, ließ den Kohlenwasserstoff an akt. Al.-Oxyd adsorbieren und fluorimetrierte die reinen benzolischen Eluate. Er gelangte so zu der empirischen Formel $\frac{C_p f}{C_{KW}} = \text{const}$, wobei C_p die Konzentration des Purins in $\mu\text{Mol/l}$ und in dem hier in Frage kommenden Konzentrationsbereich $f = 1,74$ und $\text{const} = 4,2 \cdot 10^6$ sind. Diese Formel liefert für die Benzpyrenkonzentration in Koffeinlösung der Konzentration $2,5 \text{ g/l}$ den Wert $3,4 \mu\text{Mol/l}$ und das Molverhältnis 3.4-Benzpyren/Koffein $= 0,26 \cdot 10^{-3}$. (Für kleinere Koffeinkonzentrationen nimmt das Molverhältnis kleinere Werte an.) Der direkte Intensitätsvergleich des Fluoreszenzspektrums ergibt $6,5 \cdot 10^{-7} \text{ g/ml} = 2,6 \mu\text{Mol/l}$, das sind 76,5% des Wertes nach WEIL-MALHERBE.

Diskussion der Ergebnisse

Nach Messungen von MILLER und BAUMANN¹⁵ ist die Fluoreszenzintensität von 3.4-Benzpyren in organischen Lösungsmitteln nur wenig lösungsmittelabhängig. Es kann daher angenommen werden, daß die Intensität des Fluoreszenzlichts in Proteinlösungen bei gleicher Kohlenwasserstoffkonzentration mit einem nicht sehr von 1 verschiedenen Faktor der Intensität in der alkoholischen Vergleichslösung unter Stickstoffatmosphäre entspricht.

Die lösungsvermittelnde Wirkung der Proteine ist geringer als die des Koffeins, wenn man die Mengen der pro *Gramm* lösungsvermittelnder Substanz aufgelösten Mengen 3.4-Benzpyren vergleicht. Von einem Gramm Koffein werden $26 \cdot 10^{-5} \text{ g}$, von einem Gramm β -Lactoglobulin $9,8 \cdot 10^{-5} \text{ g}$ und von einem Gramm MDH $1,1 \cdot 10^{-5} \text{ g}$ 3.4-Benzpyren dispergiert. Die *spezifische* Lösungsvermittlung liegt also bei allen Substanzen etwa in der gleichen Größenordnung. Vergleicht man jedoch die Mengen der von einem Mol Lösungsvermittler aufgelösten Mengen Benzpyren, dann kommt man zu einem anderen Bild, das Tab. 1 (letzte Kolonne) wiedergibt. Die *molare*

Lösungsvermittlung der Proteine ist erheblich größer als die des Koffeins.

Es ist aber die Frage zu diskutieren, ob die Auflösung des Benzpyrens in den Proteinlösungen möglicherweise durch eine Verunreinigung von der Art des Koffeins hervorgerufen wird. Nun ist das Molverhältnis des gelösten Benzpyrens zum Koffein um zwei Größenordnungen kleiner als zum Lactoglobulin. Darum erscheint es unwahrscheinlich, daß ein zufälligerweise im Proteinpräparat als Verunreinigung enthaltener Lösungsvermittler für die Löslichkeit des Kohlenwasserstoffs in der Proteinlösung verantwortlich sein könnte, zumal Koffein zu den besten Lösungsvermittlern für 3.4-Benzpyren gehört. Nur wenn das Protein mit einem niedermolekularen Lösungsvermittler verunreinigt wäre, für den das Molverhältnis Kohlenwasserstoff : Lösungsvermittler größenordnungsmäßig dem des Proteins entspricht, könnte wegen der ungleichen Molgewichtsverhältnisse bereits durch kleine Mengen der Verunreinigung ein solcher Effekt auftreten. Da solche Lösungsvermittler zum mindesten bis zum Augenblick nicht bekannt sind, muß wohl das Protein selbst für die Auflösung verantwortlich sein. Der beste Beweis hierfür wird allerdings erst dadurch erbracht, daß das Protein durch das aufgelöste 3.4-Benzpyren in seiner Struktur gewisse Veränderungen erleidet, was in einer späteren Arbeit mitgeteilt werden soll.

Obwohl bei manchen Ansätzen von β -Lactoglobulin größere Abweichungen der Löslichkeit beobachtet wurden, die entweder von einer nicht abgeschlossenen Einstellung des Lösungsgleichgewichtes, einer Verschiebung des Gleichgewichtes durch Temperaturschwankungen – besonders bei der Erwärmung in der Zentrifuge – oder von anderen, noch unbekanntem Einflüssen der Vorbehandlung herrührten, erreicht die Bestimmung eine Genauigkeit von etwa $\pm 5\%$ des abgelesenen Wertes.

Die Methode der Konzentrationsbestimmung durch die Messung der Fluoreszenzintensität könnte fraglich sein, wenn durch die Bindung des Kohlenwasserstoffs an die lösungsvermittelnde Substanz eine Löschung der Fluoreszenz – zum mindesten z. T. – hervorgerufen werden könnte. Wieweit das der Fall ist, könnte erst durch Messungen nach Zerstörung etwa der Proteine entschieden werden. Da aber von WEIL-MALHERBE mit einer solchen Methode beim Koffein (vgl. oben) etwa die gleichen Werte

¹⁴ H. WEIL-MALHERBE, Biochem. J. **40**, 351 [1946].
H. WEIL-MALHERBE, Biochem. J. **40**, 363 [1946].

¹⁵ J. A. MILLER u. C. A. BAUMANN, J. Amer. chem. Soc. **65**, 1540 [1943].

gefunden wurden, dürften die hier angegebenen Konzentrationen größenordnungsmäßig zutreffen. Zum mindesten stellen sie Minimalwerte dar. Das ist insofern bedeutsam, als es nicht darauf ankam, möglichst genaue Zahlenwerte für die aufgelösten

Mengen zu ermitteln, sondern überhaupt den Nachweis zu erbringen, daß Proteine in der Lage sind, den in Wasser völlig unlöslichen carcinogenen Kohlenwasserstoff in gut nachweisbaren Mengen in Lösung zu bringen.

Über die Aromatisierung von C 19-Steroiden durch *Mycobacterium smegmatis*

VON KURT SCHUBERT, KARL-HEINZ BÖHME UND CLÄRE HÖRHOLD

Aus der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena (Direktor: Prof. Dr. med. H. KNÖLL)
(Z. Naturforsch. 15 b, 584—587 [1960]; eingegangen am 19. April 1960)

Es wird ein zusammenhängender Reaktionsweg für die Umwandlung von gesättigten 17-Ketosteroiden in aromatisierte Steroide bei *M. smegmatis* beschrieben. Ein prinzipiell gleichartiger oxydativer Abbau von Steroiden wurde auch bei anderen Mycobakterien nachgewiesen. Die strukturellen Merkmale der aromatisierten *seco*-Verbindung werden im Zusammenhang mit der Carcinogenese diskutiert.

Das Smegma, eine Absonderung der Eichel- und Vorhautdrüsen, wird als cancerogener Faktor für das Gebärmutter- und Penis-Carcinom in Betracht gezogen. Die Beteiligung von Steroiden oder biogenetischen Vorläufern derselben wurde in diesem Zusammenhang erörtert¹. Aus tierexperimentellen Untersuchungen wissen wir, daß durch lokale Anwendung von Östrogenen Gebärmutterkrebs erzeugt werden kann².

Das im Smegma vorkommende *Mycobacterium smegmatis* kann auf Cholesterin als alleiniger organischer Kohlenstoffquelle wachsen. Als Endprodukte des oxydativen Abbaues von Cholesterin werden Wasser und Kohlendioxyd gebildet. Indessen gelang es bisher nicht, mit Ausnahme von Cholestenon, definierte Umwandlungsstufen zu fassen^{3, 4}. In C 21-Steroide mit einer α, β -ungesättigten Ketogruppe kann *M. smegmatis* eine Doppelbindung in Δ^1 einführen⁵.

Uns beschäftigt die Frage, in welcher Weise *M. smegmatis* Steroide umzuwandeln vermag⁶. Während bisher bei mikrobiellen Umwandlungen meist nur Einzelreaktionen oder gelegentlich eine Kombination von 2 Reaktionen untersucht wurden, können wir jetzt bei einem Mycobacterium den kompletten mehrstufigen Reaktionsablauf darlegen, der

von gesättigten C 19-Steroiden zu aromatisierten *seco*-Steroiden führt.

Material und Methoden

A. Fermentation

Mycobacterium smegmatis SG 98 wurde auf einem Nährboden, bestehend aus 0,5% Maisquellwasser, 2,0% Glucose, 0,4% Asparagin und 0,2% Glutaminsäure (pH 6,8—7,2) nach einer Anwachzeit von 2 Tagen abzentrifugiert, zweimal mit 0,003-m. Phosphat-Puffer gewaschen und in einer Nährsalzlösung nach Turfitt suspendiert (10 g Naßzellen/100 ml)⁷. Die Steroidkonzentration betrug 10 mg/100 ml Nährlösung. Das Anwachsen sowie die Umwandlungen erfolgten in Sulferkolben unter Rühren bei 37°C und konstanter Belüftung.

B. Aufarbeitung

In bestimmten Zeitabständen wurden Proben von je 5 ml mit Äther ausgeschüttelt und die Extrakte papierchromatographisch mit den Systemen Bush A und Bush B 1 untersucht. Zum Nachweis dienten die Kontaktphotographie, die Zimmerman-Reaktion und die Turnbolls-Blau-Reaktion. Der papierchromatographische Vergleich erfolgte mit Testsubstanzen. Die Umwandlungsprodukte wurden aus größeren Ansätzen nach Chromatographie an Aluminiumoxyd und Kristallisation in reiner Form erhalten. Zur Charakterisierung

¹ K. SCHUBERT, Steroide und Krebs, Probleme und neuere Ergebnisse, Dresden 1956.

² K. SCHUBERT, Arch. Geschwulstforsch. 15, 142 [1959].

³ H. J. SOBEL, J. Bacteriol. 57, 377 [1949].

⁴ F. J. LOOMEIJER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 29, 168 [1958].

⁵ E. P. 787.410 [1954].

⁶ K. SCHUBERT, K.-H. BÖHME u. CH. KÜHN, Mber. dtsch. Akad. Wiss. Berlin 1, 517 [1959].

⁷ G. E. TURFIT, Biochem. J. 38, 492 [1944].