

Über den Abbau von d-Glukosamin durch Bakterien.

Von

Emil Abderhalden und Andor Fodor.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Halle a. S.)

(Der Redaktion zugegangen am 3. August 1913.)

Ledderhose¹⁾ hat schon das Verhalten des Glukosamins bei Fäulnisprozessen studiert. Es ist ihm jedoch nicht geglückt, in einwandfreier Weise Abbaustufen zu fassen. Es schien uns wünschenswert, zum Vergleich mit dem Verhalten verschiedener Aminosäuren gegenüber von Bakterien zu prüfen, was aus Glukosamin wird. Die Versuchsanordnung war die übliche. Um auszuschließen, daß die Versuchsbedingungen allein ohne Anwesenheit von Mikroorganismen Glukosamin in bestimmter Weise veränderten, stellten wir einen Versuch mit Glukosamin allein an. Die angewandte Methodik ergibt sich ohne weiteres aus der Schilderung des Versuches selbst. Als Resultat der Untersuchung ist anzuführen, daß d-Glukosamin unter der Einwirkung des unten genauer definierten Mikroorganismus Propionsäure und ferner d-Milchsäure liefert. Offenbar ist d-Glukosamin zuerst desaminiert und dann die wahrscheinlich als Zwischenprodukt entstandene Glukose gespalten worden, oder aber, es setzt die Spaltung primär ein.

Interessanterweise erwies sich bei der bakteriologischen Diagnose die vorhandene Flora als einheitlich. Herr Dr. Ungermann, der so liebenswürdig war, die Untersuchung durchzuführen, sagt über die vorhandenen Mikroorganismen folgendes aus:

«Fäulnisgemisch I ergab auf Agar ausgesät eine Reinkultur von Bakterien, die durch das Aussehen der Kolonien als *Bazillus subtilis* anzusprechen waren. Bei längerer Beobachtung der Kolonien traten indessen Unterschiede zutage, indem dieselben nicht trockene, weiße, häutchenartige Verbände bildeten, sondern zu dicken, blaßgelben, grob gewulsteten Plaques heranwuchsen. In Bouillon bildete sich eine mehr diffuse Trü-

¹⁾ G. Ledderhose, Diese Zeitschrift, Bd. 2, S. 213 (1878); Bd. 4, S. 139 (1880).

bung aus, an der Oberfläche entstand eine dichtere mehr schleimig-zähe Bakterienmasse, nicht ein dünnes, trockenes Häutchen wie bei *Bacillus subtilis*. Mikroskopisch und färberisch verhielt sich das Bakterium wie *Subtilis*, nur zeigte es sich in geringerem Grade grampositiv wie der *Heubacillus*. Die Art steht zwischen *Bacillus subtilis* und *vulgatus* und ist vielleicht identisch mit der als *Bacillus tenuis* beschriebenen Form der *Subtilis*gruppe. »

Experimenteller Teil.

Es wurden folgende Lösungen bereitet:

I. 30 g Glukosaminchlorhydrat.

2,5 g Pepton Witte.

5,0 » wasserfreier Traubenzucker.

Spuren von Natriumphosphat und Magnesiumsulfat.

Das ganze Gemisch wurde mit Wasser auf 1 l verdünnt und mit verdünnter Sodalösung eben alkalisch gemacht.

II. 20 g Glukosaminchlorhydrat in 666 g Wasser. Die Lösung wurde mit der gleichen Sodalösung schwach alkalisch gemacht.

Lösung I wurde mit gefaultem Kaninchenpankreas geimpft und 30 Tage hindurch bei 37° aufbewahrt. Die Reaktion des Gemisches wurde von Zeit zu Zeit (im Anfange täglich) geprüft und gefunden, daß das Alkali in den ersten 14—16 Tagen auffallend rasch verbraucht wurde. Es war daher eine erneute Alkalisierung mit Soda notwendig. Bereits nach dreitägigem Verweilen im Brutschrank war die Flüssigkeit von Bakterien stark getrübt.

Lösung II wurde ebenfalls bei 37° aufbewahrt. Die ursprünglich fast farblose Flüssigkeit nahm bald eine dunkelgelbe und endlich eine dunkelbraune Farbe an. Aufbewahrungszeit: 30 Tage.

Verarbeitung der Lösung I.

Die Reaktion blieb in den letzten 8—10 Tagen konstant schwach alkalisch. Die stark getrübt, käseartig riechende und dunkelbraun gefärbte Flüssigkeit wurde nunmehr zur Entfernung des darin enthaltenen Ammoniaks unter vermindertem

Druck bei 35° eingedampft. Der Rückstand wurde dann mit Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Lösung reduzierte Fehlingsche Lösung ziemlich stark.

Diese Lösung wurde zwecks Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren mit Schwefelsäure angesäuert und der Dampfdestillation unterworfen. Es wurde so lange Wasserdampf durchgeleitet, bis das Kondensat gegen Lackmuspapier nur äußerst schwach sauer reagierte. Auf diese Weise wurden 5 l Destillat gesammelt. 50 ccm davon verbrauchten 2,03 ccm norm. Natronlauge (Phenolphthalein als Indikator). Entsprechend wurde die ganze Menge mit dem berechneten Alkali quantum versetzt und die neutrale Flüssigkeit im Vakuum eingedampft. Der Rückstand stellte einen farblosen, krystallinischen Brei vor, welcher am Wasserbade einige Male mit absolutem Alkohol verdampft wurde. Es hinterblieb schließlich eine feste, trockene Masse. Gewicht: ca. 16 g.

Eine geringe Probe dieser Salzmasse wurde in verdünnter Schwefelsäure aufgelöst. Beim Erhitzen der Lösung verrieten die entweichenden Dämpfe den Geruch der Propionsäure, dagegen konnte die Anwesenheit der ziemlich charakteristisch riechenden Buttersäure auf diesem Wege nicht festgestellt werden. Das Natronsalz wurde hierauf mit überschüssigem absolutem Alkohol am Rückfluß extrahiert, wobei das allermeiste gelöst wurde. Die klare, alkoholische Lösung wurde verdampft und ein Teil des Rückstandes in wenig Wasser gelöst. Diese ziemlich konzentrierte Lösung wurde mit verdünnter Salpetersäure vorsichtig neutralisiert und dann mit Silbernitrat gefällt. Die Fällung wurde im Dunkeln filtriert, gewaschen und getrocknet.

Analyse: 0,2333 g Substanz: 0,1840 g AgCl.

Für propionsaures Silber (= 180,97 g), ber.: 59,64% Ag,
gef.: 59,37% Ag.

Der Hauptanteil unter den flüchtigen Säuren fällt auf die Propionsäure.

Zur Gewinnung der nichtflüchtigen Säuren, und zwar zunächst der ätherlöslichen, wurde die aus der Dampfdestillation hervorgehende schwefelsaure Flüssigkeit im Extraktionsapparat

mit Äther erschöpfend (etwa 100 Stunden) ausgezogen. Die abgeheberte und getrocknete, gelbliche, ätherische Schicht hinterließ nach der Verdunstung einen hellgelben, sirupösen Rückstand (ca. 5 g). Er wurde mit Wasser aufgenommen, von Fettsuren abfiltriert, und die Lösung in einem Maßkölbchen auf 100 ccm verdünnt. Sie zeigte im 1 dm-Rohr eine Drehung der Polarisationssebene von $\alpha = + 0,10^\circ$. Auf Milchsäure berechnet, entspricht dieser Winkel — die spezifische Drehung der Milchsäure = $+ 2,24^\circ$ angenommen — einem Prozengehalt von

$$\frac{100 \cdot \alpha}{1 \cdot [\alpha]_d^{15^\circ}} = 4,46 \text{ g.}$$

Zur Identifizierung der Milchsäure wurde die Lösung mit Zinkcarbonat neutralisiert, die neutrale Lösung abfiltriert und eingedampft. Nach und nach gelangte ein Zinksalz zur Ausscheidung, und bald erstarrte die Masse zu einem dichten Brei. Dieser wurde abgesaugt und auf dem Filter mit verdünntem Alkohol gewaschen, wobei der Filterrückstand schneeweiß wurde. Gewicht 7 g, also ziemlich genau der obigen, aus der spezifischen Drehung ermittelten Ausbeute an Milchsäure entsprechend.

Analyse: 0,2290 g Substanz: 0,0661 g ZnO.

Für $C_6H_{10}O_6Zn + 2 H_2O$ (= 279,49), ber.: 23,40% Zn,
gef.: 23,19% Zn.

Von den in Äther löslichen, nichtflüchtigen Säuren ist also d-Milchsäure sicher festgestellt worden. Wie weiter unten näher ausgeführt wird, ist die Säure nicht etwa auf die Spaltung des Glukosamins durch das alkalische Medium zurückzuführen, sondern durch Bakterienwirkung bedingt.

Zur Prüfung auf ätherunlösliche nichtflüchtige Säuren, sowie auf etwa als Zwischenprodukte auftretende Aminosäuren wurde der folgende Weg eingeschlagen.

Zunächst wurde der Versuch gemacht, das etwa noch vorhandene unveränderte Glukosamin in Form seines Chlorhydrates abzuscheiden.

Die schwefelsaure Lösung, die von der ätherischen Schicht, wie oben dargetan ist, abgetrennt wurde, wurde mit verdünnter

Natronlauge neutralisiert. Die Lösung wurde hierauf im Vakuum eingedunstet und in die konzentrierte, dunkelbraun gefärbte Flüssigkeit bis zur Sättigung Salzsäuregas eingeleitet. Nach ca. 16 stündigem Stehen in der Kälte wurde die ausgeschiedene Salzmasse abgesaugt. Die letztere bestand, wie eine Glühprobe zeigte, ausschließlich aus anorganischer Substanz. Das Filtrat wurde weiter auf die Hälfte des Volumens verdampft, die Sättigung mit Salzsäuregas wiederholt, ohne daß aber beim Abkühlen und längeren Aufbewahren bei tiefer Temperatur eine Ausscheidung entstanden wäre. Es hat sich, wie aus allen diesen Beobachtungen mit großer Wahrscheinlichkeit zu schließen ist, weitaus der größte Teil und vielleicht die ganze Menge des angewandten Glukosamins verändert.

Die Lösung wurde hierauf im Vakuum vollständig verdampft und der sirupöse Rückstand mit absolutem Alkohol übergossen und in das Gemenge trockenes Chlorwasserstoffgas bis zur Sättigung eingeleitet. Das mit dem Gas gesättigte Gemisch wurde jetzt abermals bei Minderdruck völlig verdampft und der Rückstand mit Äther ausgeschüttelt. Der letztere nahm nichts auf, somit ist die Anwesenheit von Estern nichtflüchtiger, stickstofffreier (Aminosäuren!) Säuren ausgeschlossen.

Der Rückstand wurde nach der Methode von E. Fischer mit Natronlauge, Kaliumcarbonat und Äther bei tiefer Temperatur behandelt, um etwa vorhandene Aminosäureester aus den Chlorhydraten in Freiheit zu setzen. Die so erhaltene ätherische Flüssigkeit wurde getrocknet und im Vakuum bei 25° verdunstet. Es hinterblieben 1—2 Tropfen eines gelben Öles, die mit Triketohydrindenhydrat (Ninhydrin) eine außerordentlich starke Blauviolett färbung gaben. Die vorhandene Menge von Aminosäureestern war hingegen zu gering, um eine weitere Fraktionierung vorzunehmen; ferner dürfte die geringe Menge von Aminosäuren offenbar auch aus dem Pepton der Nährlösung entstammen.

Da auch etwaige, der Fäulnisreaktion entspringende Fäulnisbasen in dem zuletzt genannten ätherischen Extrakt zu suchen wären, so ist die Anwesenheit der letzteren, wenigstens in nachweisbaren Mengen, gleichfalls ausgeschlossen.

Verarbeitung der Lösung II.

Die Reaktion dieser Kontroll-Lösung blieb im Gegensatz zu Lösung I während der ganzen Zeit unverändert schwach alkalisch. Diese Beobachtung deutete schon frühzeitig auf die Tatsache hin, daß die Einwirkung einer alkalischen Lösung von dieser, für den Fäulnisprozeß angewandten Konzentration, auf das Glukosamin in Abwesenheit von Fäulnis-erregern ohne wesentliche Säurebildungsvermögen bleibt. Die weitere Prüfung konnte diese Vermutung bestätigen. Die etwas eingeengte Lösung, die Fehlingsche Lösung reduzierte, wurde nach dem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure auf die Anwesenheit von flüchtigen Säuren untersucht. Eine kleine Probe zeigte jedoch die Abwesenheit von solchen. Hierauf wurde die Lösung im Ätherextraktionsapparat mit Äther erschöpfend extrahiert. Die ätherische Lösung enthielt jedoch nur Spuren eines Rückstandes. Die Bildung der Propionsäure, sowie der Milchsäure in Versuch I ist somit ausschließlich auf die Mikroorganismen zurückzuführen.

Die mit Äther erschöpfend behandelte saure Flüssigkeit wurde weiter eingeengt, mit Natriumacetat abgestumpft und mit essigsauerm Phenylhydrazin erwärmt. Nach längerem Stehen im dunklen Eisschrank (12 Stunden) wurde ein dunkles, gummiartiges Produkt abgeschieden, das nicht weiter untersucht wurde.
