

Zur Chemie der Bakterien.

IV. Mitteilung.

Zur Kenntnis der in den Bakterien enthaltenen Kohlenhydrate.

Von

Sakae Tamura (Tokio).

(Aus dem Hygienischen und dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 15. Januar 1911.)

Für die Mikroorganismen liegen zahlreiche Einzelangaben¹⁾ über ihren Gehalt an Kohlenhydraten vor; doch beschränken sich die genaueren Analysen wesentlich auf das Gebiet der «Bakterienschleime», welche besonders das Interesse der Nahrungsmittelchemiker auf sich gezogen haben. Diese Schleimssubstanzen enthalten — sofern sie überhaupt der Kohlenhydratgruppe zugehören — Hexose- und Pentosegruppen, nach einigen Autoren auch chitinartige Stoffe und entstehen zum Teil durch Umwandlung der äußeren Schichten des Bakterienkörpers.

Nach der Angabe von Bendix²⁾ hat man in den übrigen Bakterien schon lange folgende drei Eigenschaften kennen gelernt, die das Vorhandensein von Kohlenhydraten, namentlich Pentose, vermuten lassen: 1. Die Bakterienkörper reduzieren die Fehlingsche Lösung, 2. sie zeigen die Tollenssche Phloroglucinsalzsäurereaktion, 3. sie bilden mit Essigsäurephenylhydrazin ein gelbes nadelförmiges Osazon, dessen Schmelzpunkt 160° C. ist.

¹⁾ Ein genaueres Literaturverzeichnis findet sich bei «Kruse, Allgemeine Mikrobiologie», ferner bei «Czapek, Biochemie der Pflanze», II. Auflage, Bd. 1. Siehe auch H. Kossel, Handbuch der pathogen. Mikroorganismen, herausgegeben von W. Kolle und Wassermann, II. Auflage, Bd. 5 (Tuberkelbacillen), Lafar, Handbuch der Mykologie u. Biochemisches Handlexikon, herausgegeben von E. Abderhalden. Bd. 2, S. 70.

²⁾ Deutsche Med. Wochenschrift 1901.

Für die Untersuchung der reduzierenden Substanzen habe ich die ganze Menge der aufbewahrten Filtrate, die durch Phosphorwolframsäure von den Nucleinbasen getrennt waren (siehe I. Mitteilung diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 100), benutzt. Nach einigen vorläufigen orientierenden Versuchen verfuhr ich bei den Untersuchungen mit je 50 g getrockneten *Mykobact. lact.* und Tuberkelbacillen, sowie mit 45 g Diphtheriebacillen (siehe vorhergehende Mitteilung S. 5) in der folgenden Weise.

Die durch Äther und Alkohol möglichst entfetteten Bakterien wurden mit der Mischung von zwei Teilen Schwefelsäure und einem Teil Wasser gründlich zerrieben, bis die Bakterienstruktur bei der mikroskopischen Untersuchung nicht mehr sichtbar war. Die dabei entstandenen sirupösen Lösungen wurden mit großen Mengen Wasser verdünnt. Dadurch gingen alle Kohlenhydrate, welche die Orcinsalzsäurereaktion zeigten, in Lösung, während die Eiweißkörper als weißer flockiger Niederschlag gefällt waren. Die von der Eiweißmasse abfiltrierten klaren Lösungen wurden mittels Baryt von der Schwefelsäure befreit und sodann zur Sirupkonsistenz eingedampft. Diese sirupöse Masse hat folgende Eigenschaften: Reduktion der Kupferoxydlösung in alkalischer Reaktion, Tollenssche Orcinsalzsäurereaktion, Osazonbildung mit Essigsäurephenylhydrazin und keine Vergärungsfähigkeit mit stark wirkender Bierhefe.

Der sirupöse Verdampfungsrückstand wurde dann (ohne vorherige Entfernung der festen Ausscheidungen, die meistens aus Salzen bestanden) mit der dreifachen Menge absoluten Alkohols auf dem Wasserbade ausgekocht. Nach etwa 5 Minuten war die Hauptmasse der vorhandenen Pentose ausgezogen, die Lösung wurde abgekühlt und jetzt filtriert. Eine Probe des zurückbleibenden Sirups wurde in wenig Wasser gelöst und auf Pentose geprüft. Im Falle, daß sich hierbei noch erhebliche Pentosereaktion zeigte, wurde die Gesamtmasse des Rückstandes mit wenig Wasser durchgefuechtet und nochmals mit der gleichen Menge absoluten Alkohols extrahiert.

Diese Alkohollösung enthielt eine Substanz, die die Tollenssche Orcinsalzsäurereaktion zeigt, während die unlösliche Masse nur noch Reduktionsvermögen besitzt, aber keine

Pentosereaktionen ergibt. Die erstere, d. i. die alkoholische Lösung, ist weiterhin als «Pentosenfraktion» und die letztere, der unlösliche Rückstand, als «Hexosenfraktion» bezeichnet.

Pentosenfraktion.

Die vereinigten alkoholischen Auszüge wurden, wenn nötig, von einigen flockigen Ausscheidungen abfiltriert und mit Tierkohle entfärbt. Die berechnete Menge asym. Benzylphenylhydrazin wurde nach der Angabe von Ruff und Ollendorf¹⁾ der auf ein kleines Volumen verdampften alkoholischen Zuckerlösung zugefügt. Ich ließ sie dann einige Stunden in der Kälte stehen und filtrierte sie, als sich Hydrazonkrystalle gebildet hatten. Die ausgeschiedenen weißen Krystalle hatten Nadelform und wurden nach Umkrystallisation aus absolutem Alkohol analysiert.

Die Krystallisation des Hydrazons aus der alkoholischen Lösung wurde in manchen Fällen durch das Vorhandensein von kleinen Quantitäten eines stickstoffhaltigen Stoffes unbekannter Herkunft erschwert. Offenbar ließen sich diese Beimengungen durch die Reinigungsoperation, welcher die alkoholische Zuckerlösung unterworfen wurde, nicht vollständig entfernen. Es erwies sich dabei als vorteilhaft, sie mit einigen Tropfen Bromeisessig zu versetzen.

1. Arabinose: Die in oben beschriebener Weise auskrystallisierte Pentoseverbindung aus *Mykobact. lact.* schmolz bei 165° C. (unkorr.) und wog ungefähr 0,1 g aus 50 g getrockneten Bakterien.

Die Analyse²⁾ ergab folgende Zahlen:

5,46 mg Substanz: 0,387 ccm N (13°, 760 mm).

3,75 „ „ : 8,96 mg CO₂, 2,32 mg H₂O.

C₁₈H₂₈N₂O₄. Ber: C 65,46%, H 6,72%, N 8,48%.

Gef.: C 65,16%, H 6,92%, N 8,46%.

0,20 g Substanz wurden in 10 ccm Pyridin gelöst; die Lösung drehte bei Zimmertemperatur (20° C.) 0,25° nach links.

¹⁾ Berichte der Deutschen Chem. Gesellschaft, Bd. 32, S. 3234.

²⁾ Die Elementaranalysen wurden nach Pregl ausgeführt.

Die nach dem Verfahren von Ruff und Ollendorf dargestellte Benzylphenylhydrazinverbindung stimmt im Aussehen, im Schmelzpunkt, in der Analyse und im Drehungsvermögen mit einem aus reiner rechtsdrehender l-Arabinose dargestellten Präparate der gleichen Verbindung überein.

Die gleiche Verbindung wurde in etwas geringerer Menge aus Tuberkelbacillen gewonnen. In ihren Eigenschaften stimmt sie völlig mit der oben dargestellten Substanz aus *Mykobact. lact.* überein. $F = 165^{\circ} \text{C}$.

Die Analyse ergab folgendes:

4,05 mg Substanz: 0,294 ccm N (15° , 760 mm).

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_2$. Ber. N: 8,48, gef. N: 8,60%.

Die aus Diphtheriebacillen dargestellten Krystalle von Arabinosebenzylphenylhydrazon schmolzen ebenfalls bei 165°C . und erschienen in Form ganz weißer Nadeln.

Die Analyse ergab folgende Zahlen:

5,87 mg Substanz: 0,415 ccm N ($12,5^{\circ}$, 763 mm).

3,310 „ „ : 7,90 mg CO_2 , 2,09 mg H_2O .

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$. Ber.: C 65,46, H 6,72, N 8,48.

Gef: C 65,09, H 7,06, N 8,48.

Die Menge die Hydrazons aus 45 g Diphtheriebacillen war ungefähr 0,1 g.

2. Xylose: Ziemlich große Mengen der alkoholischen Pentosefraktion wurden für den Nachweis der Xylose verwandt und alle Versuche, sie nach Bertrand und Tollens¹⁾ durch Verwandlung des Zuckers mittels Bromwasser in Xylonsäure als Cadmiumbromdoppelsalz, oder nach Neuberg²⁾ als Brucinsalz zu isolieren, waren in diesem Falle ganz vergebens. Auch gelang es nicht, aus der Mutterlauge der Arabinosebenzylphenylhydrazonkrystalle eine Xyloseverbindung nach der Methode von Ruff und Ollendorff durch die Verdünnung mit Wasser abzuscheiden. Die untersuchten Bakterien enthalten also wahrscheinlich keine Xylose.

Die Zucker der Pentosen finden sich bekanntlich nur ausnahmsweise in freiem Zustande in der Natur vor, sind aber

¹⁾ Bull. soc. chim., Paris (3), Bd. 5, S. 556.

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 35, S. 1473.

in Form ihrer anhydridartigen Muttersubstanzen namentlich im Pflanzenreiche sehr verbreitet. Auch im Bakterienreich von *Bact. parabinum*, *B. acaciae*, *B. metarabinum*, *B. persicae* sind bereits Pentosen gefunden worden. Nach obigen Befunden ist kein Zweifel, daß der Tuberkelbacillus, *Mykobact. lact.* und *Diphtheriebacillus* alle eine Pentose und zwar l-Arabinose enthalten.

Von erheblichem Interesse ist die Frage, ob bei den Bakterien, wie bei den höheren Pflanzen echte Cellulose vorhanden ist oder Chitin. Die Antwort lautet bis jetzt verschieden, je nach dem untersuchten Material und den untersuchenden Autoren. Hammerschlag¹⁾ glaubte in dem Tuberkelbacillus Cellulose gefunden zu haben, ein Befund, der von Nischimura nicht bestätigt werden konnte. Während Wisselingh²⁾ berichtete, daß in keiner der untersuchten Bakterien Cellulose oder Chitin nachgewiesen werden konnte und Aronson³⁾ sich bei *Diphtheriebacillen* weder von der Anwesenheit von Cellulose noch von Chitin überzeugen konnte, liegen Angaben von Iwanoff⁴⁾ und Burri und Alleman⁵⁾ vor, wonach Chitin in Bakterien verbreitet vorkomme. Nach Helbing⁶⁾ und Panzer⁷⁾ ist in den *Tuberkelbacillen* Chitin wahrscheinlich vorhanden und A. Viehoveer⁸⁾ hat kürzlich Chitin nach der Methode von Wisselingh bei einer Anzahl von Bakterien mikrochemisch nachgewiesen.

Ich habe diese Frage einer erneuten Prüfung unterworfen und verfuhr in folgender Weise:

15 g der mit Hilfe von Äther und Alkohol entfetteten, sehr fein zerriebenen *Mykobact. lact.* wurden mit heißer 1%iger Natronlauge auf dem Wasserbade wiederholt extrahiert, bis das vom Rückstand durch Abheben getrennte Extrakt keine

¹⁾ Centr. klinische Med., 1891, Nr. 1.

²⁾ Zitiert aus «Mykrobiologie» v. Kruse, S. 79.

³⁾ Arch. Kinderheilk., Bd. 30, S. 52.

⁴⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. 1, S. 524.

⁵⁾ Centr. für Chemie, 1909, II.

⁶⁾ Deutsche med. Wochenschrift, 1900, Nr. 23.

⁷⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 78, S. 414.

⁸⁾ Centr. f. Chemie, 1913, I, S. 728.

Pentose- und Eiweißreaktion gab. Der Rückstand wurde hierauf mit Wasser bis zum Verschwinden des Alkalis gewaschen, dann mit Alkohol und Äther heiß extrahiert und diese Operationsreihe (d. i. 1% Natronlauge-, Wasser-, Alkohol- und Ätherextraktion) mehrmals wiederholt. Schließlich blieb 1,2 g einer weißen Masse zurück, die in heißer Natronlauge aufquoll, aber keine Eiweißreaktion zeigte. Diese aufgequollene Masse reduzierte die Kupferlösung in alkalischer Reaktion nicht und schied sich bei der Alkoholbehandlung wieder pulverig aus. Wurde sie dagegen mit verdünnter Mineralsäure gekocht, dann trat bei der Prüfung des hydrolysierten Produktes mit Kupferlösung reichliche Reduktion ein, auch zeigte sich beim Erhitzen mit Orcinsalzsäure die charakteristische grüne Farbe, woraus auf das Vorhandensein von Pentosen zu schließen ist. Hiernach muß man annehmen, daß die oben dargestellte Pentose in dem Bakterienleib in zwei Verbindungsarten vorhanden ist; während die erste bei der Behandlung mit 1%iger Natronlauge leicht in Lösung übergeht, ist die zweite nicht mit Natron, sondern erst beim Kochen mit verdünnter Mineralsäure abspaltbar. In chemischer Beziehung unterscheidet sich diese Substanz aus *Mykobact. lact.* scharf von echter Cellulose und auch vom Chitin. Sie zeigt folgendes Verhalten: 1. sie wird durch kochende, 3%ige Schwefelsäure leicht gespalten; 2. sie gibt mit wässriger oder alkoholischer Jodlösung und mit Jodjodkali keine Reaktion, welche auf Chitin hinweisen könnte; 3. mit Chlorzinkjod gibt sie nicht die für Cellulose charakteristische Reaktion; 4. sie löst sich nicht in Kupferoxydammoniaklösung.

Dieser Rückstand enthielt fast immer noch Proteinstoffe, die in die Kohlenhydrate eingeschlossen sind, und es ist schwierig auf diesem Wege Präparate zu erhalten, die ganz frei von Eiweiß sind, obwohl ich diese Masse mehrere Monate lang mit 1%iger Natronlauge in der Kälte extrahiert hatte. Indes dürften die folgenden Beobachtungen trotz der Beimengung von Proteinresten sichere Schlüsse auf die Natur der Kohlenhydrate gestatten.

Der bei der Behandlung der zerriebenen Bakterien mit den genannten Extraktionsmitteln verbliebene Rückstand, dessen

Menge 0,9 g betrug, wurde mit 3%iger Schwefelsäure (50 ccm) eine halbe Stunde auf dem Wasserbad erhitzt; eine geringe flockige Masse wurde abfiltriert. In dem klaren Filtrat wurde die Schwefelsäure mit Baryt entfernt und wieder filtriert. Dieses klare, farblose, neutrale Filtrat wurde eingedampft, der dabei erhaltene Sirup in absolutem Alkohol gelöst und die Lösung mit Benzylphenylhydrazin versetzt.

Binnen 24 Stunden schieden sich aus der Flüssigkeit weiße Krystalle aus, die sich bei längerem Stehen noch allmählich vermehrten; sie wurden einmal aus heißem absolutem Alkohol umkrystallisiert. Die in dieser Weise gewonnene Verbindung der Arabinose wog etwas weniger als 10 mg und zeigte die gleichen Eigenschaften wie ein aus reiner Arabinose erhaltenes Benzylphenylhydrazon. Die Krystalle schmolzen gleichzeitig mit den letzteren bei 165° C.

Die Analyse ergab folgende Zahlen:

2,10 mg Substanz: 0,150 ccm N (14,5°, 752 mm).

$C_{18}H_{22}N_2O_4$. Ber. N: 8,48%, gef. N: 8,38%.

Diese Versuche zeigen, daß in den untersuchten Bakterien Kohlenhydrate vorhanden sind, welche zu der von E. Schulze aufgestellten Gruppe der Hemicellulosen gehören. Die Hemicellulosen unterscheiden sich bekanntlich von der echten Cellulose dadurch, daß sie schon durch weniger intensive Säurewirkung leicht hydrolysiert werden. Die Analyse zeigt ferner, daß diese Hemicellulose ein «Araban» ist.

Auch aus dem Tuberkelbacillus (4 g) wurde ein Körper von gleichen Eigenschaften gewonnen.

Aber die Menge des Arabinosebenzylphenylhydrazons war in diesem Fall nicht hinreichend, um damit die genaue Analyse zu machen. Schmelzpunkt und Aussehen stimmen gut mit der Arabinoseverbindung überein.

Hexosefraktion.

Wie oben erwähnt, hat die in Alkohol unlösliche sirupöse Masse noch reduzierende Eigenschaften, gibt aber keine Pentosereaktion. Diese Masse wurde in Wasser gelöst und mit Essigsäurephenylhydrazin gekocht. Es scheiden sich feine nadel-

förmige, gelbe Krystalle aus, die nach Umkrystallisation aus heißem Wasser bei 170° C. unter heftiger Gasentwicklung schmolzen.

Die Analyse ergab folgende Zahlen:

1. 6,47 mg Substanz aus Mykobakt. lact.: 0,868 ccm N (21° C., 757 mm).
 $C_{18}H_{28}O_4N_4$. Ber. N: 15,64%, gef. N: 15,51%.
2. 5,04 mg Substanz aus Tuberkelbazillen 0,656 ccm N (20° C., 759 mm).
 $C_{18}H_{28}O_4N_4$. Ber. N: 15,64%, gef. N: 15,14%.

Die Menge des in gleicher Weise aus Diphtheriebacillen erhaltenen sirupösen Rückstandes war sehr gering und das gebildete Osazon reichte für die weitere Untersuchung nicht aus.

Genauere Angaben über die Natur der betreffenden Hexosen können zurzeit nicht gemacht werden, doch wurde festgestellt, daß es sich um einen nicht gärungsfähigen Zucker handelt.

Somit ergibt sich, daß in den drei untersuchten Bakterien, Diphtheriebacillen, Tuberkelbacillen und Mykobact. lact., l-Arabinose vorhanden ist und zwar teilweise als Araban; außerdem ist das Vorhandensein einer Hexose in den Mykobact. lact. festgestellt.

Zum Schluß spreche ich meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Professor A. Kossel und Herrn Professor H. Kossel, für ihre Anregungen und Leitung meinen herzlichsten Dank aus.
