Die Aminosäuresequenz des Serin und Asparaginsäure enthaltenden Mureins von *Bifidobacterium bifidum* Orla Jensen

The amino acid sequence of the serin and aspartic acid containing mureins
of *Bifidobacterium bifidum* ORLA JENSEN

DIETER KOCH, KARL HEINZ SCHLEIFER und OTTO KANDLER

Botanisches Institut der Universität München

(Z. Naturforsch. 25 b, 1294—1301 [1970]; eingegangen am 1. Juli 1970)

Cell walls of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus* were isolated. The polysaccharide consisted of glucose, galactose and rhamnose. Teichoic acid was not present. The murein (peptidoglycan) contained MurNAc, GlcNH₂NAc, D-Glu, Ala, L-Ser, D-Asp and L-Orn in a ratio of about 1 : 1 : 1 : 2 : 1 : 1 : 1. In one batch a high amount of L-glutamic acid was found. It was not a constituent of the murein since it remained in the lysozyme insensitive residue.

The amino acid sequence of the murein was determined by analyzing the oligopeptides arising during partial acid hydrolysis. It was shown that the peptide subunits attached to the muramic acid are the same as in many other mureins: L-Ala-D-Glu-L-Orn-D-Ala. The interpeptide bridge consisted of β -D-aspartyl-L-serine. Since about 35% of aspartic acid and 6% of ornithine are N-terminal in the cell wall, it was assumed that only 60% of the peptide subunits are cross-linked. 4 other strains of *B. bifidum* proved to contain the same type of murein. While all other strains of other species of *Bifidobacterium* investigated contained other types of murein, it seems likely that the Orn-Ser-Asp type of the murein is typical of *B. bifidum*.

Bereits CUMMINS et al.¹ stellten fest, daß die Zellwand verschiedener Stämme von Bifidobakterien unterschiedliche Aminosäuren-Zusammensetzung aufweisen. Sie fanden, neben den in den Mureinen allgemein vorkommenden Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure und Lysin, auch Glycin, Serin, Threonin und Asparaginsäure in verschiedenen Molverhältnissen. In eigenen Untersuchungen an einer größeren Zahl von Stämmen ergab sich ebenfalls eine Vielfalt von Kombinationen, und wir bemühten uns um die Aufklärung der Aminosäuresequenz. Nachdem wir kürzlich die Typen beschrieben, bei denen die Interpeptidkette aus Glycin² bzw. Alanin³ besteht, soll im folgenden der Typ näher dargestellt werden, bei dem die Quervernetzung durch β -D-Aspartyl-L-Serin hergestellt wird. Dies ist bei *Bifidobacterium bifidum* ORLA JENSEN (früher vielfach als *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* bezeichnet) der Fall. Bei dieser Art hatten schon VEERKAMP et al.⁴ gefunden, daß die Zellwand an Stelle von L-Ly-

sin L-Ornithin enthält und daß neben Serin und Asparaginsäure auch eine erhöhte Menge an Glutaminsäure vorhanden ist.

Material und Methoden

a) Stamm und Kulturmethode

Verwendet wurde der Stamm ATCC 11863. Es handelt sich um den in der Literatur oft zitierten „*Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*“⁴⁻⁷. Folgende von uns untersuchten Eigenschaften weisen ihn als echtes *Bifidobacterium* aus:

Der Keim ist anaerob bis mikroaerophil und zeigt die typische Pleomorphie (Verzweigung, Auftreibungen). Er ist katalasenegativ und reduziert kein Nitrat. In M/15 Phosphatpuffer pH=6,3 bilden Zellen der stationären Phase aus Glucose L(+)-Milchsäure und Essigsäure im Verhältnis 2 : 3, aber keine signifikanten Mengen an CO₂.

Zur Prüfung der Vergärung verschiedener Zucker wurde das Sediment von 10 ml einer dicht gewachsenen Suspension (Medium: MRS⁸ mit Zusatz von 1% Ascor-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. O. KANDLER, Bot. Institut d. Universität München, D-8000 München 19, Menzinger Str. 67.

¹ C. S. CUMMINS, O. M. GLENDENNING u. H. HARRIS, Nature [London] **180**, 337 [1957].

² O. KANDLER, D. KOCH u. K. H. SCHLEIFER, Arch. Mikrobiol. **61**, 181 [1968].

³ W. H. HOLZAPFEL, V. SCARDOVI u. O. KANDLER, Z. Naturforsch. **24 b**, 1524 [1969].

⁴ J. H. VEERKAMP, R. LAMBERT u. Y. SAITO, Arch. Biochem. Biophysics **112**, 120 [1965].

⁵ P. GYÖRGY, Pediatrics **11**, 98 [1953].

⁶ P. GYÖRGY, R. NORRIS u. C. S. ROSE, Arch. Biochem. Biophysics **48**, 193 [1954].

⁷ G. REUTER, Zbl. Bakteriologie. Abt. I, Orig. **191**, 486 [1963/64].

⁸ J. C. DE MAN, M. ROGOSA u. M. E. SHARPE, J. appl. Bacteriol. **23**, 130 [1960].

binsäure und 0,02% Cysteinhydrochlorid) in 1 ml einer steril filtrierten, 1-proz. Ascorbinsäurelösung aufgeschwemmt und davon je 0,1 ml in die einzelnen Röhrchen der „bunten Reihe“ eingimpft. Das Basalmedium für die „bunte Reihe“ war MRS ohne Glucose und Ascorbinsäure. Die Ablesung erfolgte mehrmals in einem Zeitraum von 3–5 Tagen. Der Stamm vergor die Zucker Glucose, Galaktose, Saccharose, Maltose, Raffinose und Melibiose. Nicht vergoren wurden die Pentosen Arabinose und Xylose, die Zuckeralkohole Sorbit und Mannit sowie das Glykosid Salicin. Auf Grund dieser Merkmale wurde der Stamm dem Schlüssel REUTERS⁷ folgende der Art *Bifidobacterium bifidum* zugeordnet.

Für Massenkulturen wurde MRS-Medium unter Zusatz von 1% Ascorbinsäure und 0,02% Cysteinhydrochlorid in 10-l-Steilbrustflaschen (37 °C) verwendet. Durch die hohe Schicht der Lösung (die Steilbrustflaschen wurden bis zum Flaschenhals gefüllt) und die Zusätze an Ascorbinsäure und Cystein waren ausreichend anaerobe Bedingungen gegeben.

b) Zellwandpräparation und Analysemethoden

Die Gewinnung, Reinigung, Fraktionierung (Extraktion mit TES und Formamid), Dinitrophenylierung und Hydrazinolyse der Zellwände sowie die qualitative Analyse der Total- und Partialhydrolysate erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in der früher beschriebenen Weise⁹. Die quantitativen Bestimmungen der Aminosucker- und Aminosäure-Zusammensetzung der Zellwand wurden mit Hilfe eines Aminosäuren-Analysators der Fa. Beckman, Typ 120 C, durchgeführt.

Zur Konfigurationsbestimmung wurden die Aminosäuren aus dem Totalhydrolysat papierchromatographisch isoliert. Von Alanin konnten beide Isomere enzymatisch bestimmt werden¹⁰. Bei Serin, Glutaminsäure und Asparaginsäure wurden enzymatische Bestimmungen entweder nur auf die D-Form (bei Serin)¹⁰ oder auf die L-Form (Glu und Asp) durchgeführt. Der Anteil der enzymatisch nicht bestimmaren Isomeren ergab sich aus der Differenz zwischen Gesamtmenge und enzymatisch bestimmter Menge. Die Gesamtmenge wurde in aliquoten Teilen der isolierten Aminosäuren in Anlehnung an die Methode von GHUYSEN et al.¹¹ bestimmt. Dazu wurde ein aliquoter Teil mit 0,1 ml 1-proz. äthanolischer FDNB-Lösung und 2,1 ml 1-proz. Na₄B₂O₇-Lösung versetzt und 30 Min. im Wasserbad bei 60° erwärmt. Das Gemisch wurde nach dem Abkühlen mit 0,5 ml 2 N HCl versetzt und die Extinktion bei 420 nm gegen eine Blindprobe (alle Reaktionsteilnehmer ohne Aminosäure) gemessen (Schichtdicke 1 cm).

Zur Konfigurationsbestimmung von Glutaminsäure, Asparaginsäure und Ornithin wurde außerdem die optische Rotationsdispersion der jeweiligen DNP-Derivate

im Bereich der Schulter der Absorptionsspektren (418 nm) gemessen. Der dort auftretende Cotton-Effekt erlaubt eine eindeutige Bestimmung der Drehrichtung auch bei sehr kleinen Mengen. Zum Vergleich dienten authentische DNP-Derivate.

c) Chromatographie

Laufmittel zur chromatographischen Trennung von Aminosäuren, Zucker, Muropeptiden

- A) Isopropanol : Wasser : Eisessig 70 : 15 : 10 v/v,
- B) α -Picolin : Wasser : Ammoniak 70 : 28 : 2 v/v,
- C) Butanol : Pyridin : Wasser : Eisessig 50 : 280 : 210 : 21 v/v.

DNP-Derivaten (Papier- oder Zellulose-Dünnschichtplatten)

- D) Wasser : n-Butanol : Eisessig 5 : 4 : 1 v/v, obere Phase des Gemisches, E) n-Propanol : 0,2% Ammoniak 8 : 2 v/v, F) 1,5 M Phosphatpuffer pH 6,0.

DNP-Derivaten (Kieselgel-Dünnschichtplatten)

- G) Chloroform : tert. Amylalkohol : Eisessig 70 : 30 : 3 v/v.

Aminosäuren und Peptide wurden durch Besprühen mit Ninhydrinlösung, Zucker mit Hilfe von alkalischem Silbernitrat nachgewiesen.

Ergebnisse

1. Die Zusammensetzung der Zellwand

a) Der Aminosäuregehalt

Molverhältnisse

Es wurden 2 Chargen von Zellwänden hergestellt, wobei jeweils ein Teil nach der Reinigung durch Inkubation mit Trypsin noch mit Trichloressigsäure (TES) und weiter mit heißem Formamid extrahiert wurde. Die entsprechenden Präparationen werden im folgenden abgekürzt mit ZW-Tryp, ZW-TES und ZW-FA bezeichnet. Die Ergebnisse der quantitativen Aminosäurenanalyse der Hydrolysate der verschiedenen Präparationen zeigt die Tab. 1. Während die Charge I „normale“ Molverhältnisse von 1 Mol Glutaminsäure pro Mol Diaminosäure aufweist, zeigt die Charge II einen erheblichen Überschuß von Glutaminsäure, der nicht zum Murein der Zellwand gehört, wie weiter unten ausführlicher dargestellt wird.

⁹ K. H. SCHLEIFER u. O. KANDLER, Arch. Mikrobiol. 57, 335 [1967].

¹⁰ H. U. BERGMAYER, Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1962.

¹¹ J. M. GHUYSEN, D. J. TIPPER u. J. L. STROMINGER, in: S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN (ed.), Methods in enzymology, 8, 685 [1966].

ZW-Präparation			Ala	Glu	Orn	Ser	Asp	GlcNH ₂	Mur
Charge I	ZW-Tryp	a	0,50	0,24	0,24	0,22	0,22	0,25	0,28
		b	2,01	1,00	1,00	0,92	0,92	1,04	1,17
	ZW-Tryp, DNP	a	0,47	0,25	0,25	0,20	0,15	0,26	0,27
		b	1,88	1,00	1,00	0,80	0,60	1,04	1,08
	ZW-TES	a	0,48	0,25	0,24	0,22	0,23	0,25	0,26
		b	2,00	1,04	1,00	0,92	0,96	1,04	1,08
	ZW-TES, DNP	a	0,47	0,25	0,25	0,20	0,15	0,25	0,28
		b	1,88	1,00	1,00	0,80	0,60	1,00	1,12
	ZW-FA	a	0,64	0,34	0,32	0,19	0,28	0,33	0,35
		b	2,00	1,06	1,00	0,59	0,88	1,03	1,10
Charge II	ZW-Tryp	a	0,30	0,75	0,16	0,15	0,16	0,17	0,20
		b	1,88	4,69	1,00	0,94	1,00	1,06	1,25
	ZW-FA	a	0,42	0,96	0,21	0,11	0,20	0,22	0,24
		b	2,00	4,57	1,00	0,52	0,95	1,05	1,14

Tab. 1. Übersicht über den Gehalt an Aminosäuren und Aminosukern der verschiedenen Zellwandpräparationen. a = μ Mol/mg, b = Molverhältnis bezogen auf Ornithin.

Serin wurde bei der Extraktion mit heißem Formamid teilweise zerstört.

Neben den angeführten Aminosäuren ergaben die Analysen noch einen Gehalt an NH₃ von 1,2 bis 1,5 Molen pro Mol Ornithin. Eine Hydrolysekinetik zeigte, daß schon nach 1 Stde. Hydrolyse in 2 N HCl bei 100 °C rund 1 Mol NH₃ pro Mol Gesamtornithin freigesetzt wird und anschließend nur eine sehr langsame Freisetzung weiteren NH₃ erfolgt. Das zeigt, daß pro Mol Muropeptide 1 Mol Amidstickstoff vorhanden ist. Der über diesen Wert hinausgehende Ammoniak des Gesamthydrolysats stammt vermutlich aus der allmählichen Zerstörung der Aminosucker im Verlauf der Hydrolyse.

Konfigurationsbestimmung

Die Bestimmung der Konfiguration der Aminosäuren ergab für Ornithin und Serin die L-, für Asparaginsäure die D-Konfiguration. Das Verhältnis von L-Alanin zu D-Alanin betrug 1,2 : 1,0. Die Glutaminsäure lag in Charge I ausschließlich in der D-Form vor, während bei Charge II die vierfache Menge an L- gegenüber D-Glutaminsäure enthalten war.

N- und C-terminale Aminosäuren

Die papier- und dünnschichtchromatographische Analyse der Hydrolysate von DNP-Zellwänden (ZW-Tryp) ergab als einzige DNP-Derivate, DNP-Ornithin und DNP-Asparaginsäure. Die quantitative Bestimmung¹² zeigte, daß rund 6% des Ornithins und 35% der Asparaginsäure der Zellwand eine freie

Aminogruppe besaßen. Auch aus der Differenz der Molverhältnisse zwischen normalen und DNP-Zellwänden, wie sie die Tab. 1 zeigt, ergibt sich ein entsprechender Prozentsatz für N-terminale Asparaginsäure. Der Unterschied im Ornithingehalt liegt noch innerhalb der Fehlergrenze der Analysen.

Die Hydrazinolyse zeigte etwa 2–3-mal so viel freies Alanin wie freies Ornithin. Demnach ist neben Alanin auch etwas Ornithin C-terminal.

b) Der Phosphatgehalt der Zellwände

Die Tab. 2 zeigt die Ergebnisse der Phosphatbestimmung bei verschiedenen Zellwandpräparationen. Die Werte liegen um 1% und damit deutlich

Zellwandaufarbeitung	PO ₄ ³⁻ [%]
ZW-tryp	1,06
ZW-TES	0,52
ZW-FA	0,15

Tab. 2. Phosphatgehalt der Zellwand (Charge I).

unter den Werten teichonsäurehaltiger Zellwände. Da auch aus dem TES-Extrakt der tryptisch verdauten Zellwände keine Teichonsäure ausgefällt werden konnte, kann man annehmen, daß in der Zellwand keine Teichonsäure vorkommt.

Der geringe Phosphatgehalt von 1% geht vermutlich auf Phosphordiesterbindungen zwischen Polysaccharid und Murein zurück.

c) Der Zuckergehalt der Zellwände

Bei der Behandlung mit Formamid wird nur ein Teil des Polysaccharids extrahiert. Von 500 mg

¹² H. FRANKEL-CONRAT u. B. SINGER, Arch. Biochemistry **60**, 64 [1956].

TES-extrahierter Zellwände wurden nach der Behandlung mit Formamid 361 mg Zellwände wiedergewonnen, also 72% der eingesetzten Menge. Die Ausbeute an dialysiertem Formamidextrakt, der neben Polysaccharid auch Spuren von Murein enthielt, betrug 110 mg, das sind 79% des Gewichtsverlustes, den die TES-Zellwand durch die Formamidextraktion erlitten hat. Die Aminosäureanalysen (Tab. 1) zeigen, daß sich auch in der formamidextrahierten Zellwand nur rund 40% Murein (berechnet auf der Basis des Gehaltes an Ornithin unter Berücksichtigung der Mureinstruktur der Abb. 2) befinden, d. h. daß ein erheblicher Teil des Polysaccharids nicht extrahierbar ist.

Das Hydrolysat (2 N HCl; 2 Stdn. 100 °C) des Polysaccharids der Zellwand enthält an Zuckern Glucose, Galaktose und Rhamnose, wobei nach der Intensität der Flecken zu schließen ein starker Überschuß an Rhamnose besteht, den auch VEERKAMP et al.⁴ erwähnen.

2. Lysozymspaltbarkeit der Zellwände und Zusammensetzung der Spaltprodukte

Der Überschuß an L-Glutaminsäure in Charge II bleibt auch bestehen, wenn man die Zellwand mit TES und Formamid extrahiert (s. Tab. 1). Da der Glutaminsäureüberschuß nur bei einer der beiden Chargen auftrat war zu vermuten, daß diese „zusätzliche“ Glutaminsäure nicht Bestandteil des Mureins, sondern einer anderen von den Wachstumsbedingungen abhängigen Zellwandkomponente ist. Daher wurde die Zellwand mit Lysozym gespalten und die dabei entstehenden Spaltprodukte nach papierchromatographischer Trennung auf ihre Zusammensetzung untersucht. Der hohe Gehalt an Glutaminsäure müßte auch in den Spaltprodukten auftreten, wenn diese Glutaminsäure ein Bestandteil des Mureins wäre.

In Vorversuchen wurde zunächst die Spaltbarkeit der Zellwand mit Lysozym geprüft. Hierzu wurden die mit Trypsin behandelten bzw. mit TES und Formamid extrahierten Zellwände in 0,1 M Ammonacetatpuffer pH = 6 suspendiert. Zu 2,5 ml der Suspension wurde 0,5 ml einer Lysozymlösung gegeben (600 γ /ml, gelöst in obigem Puffer) und die Extinktionsabnahme bei 650 nm gemessen. Tryptisch verdaute und TES-extrahierte Zellwände zeigten im Verlauf von einer Stde. keine Extinktionsabnahme,

während formamidextrahierte Zellwände gut gespalten werden.

Zur Gewinnung größerer Mengen von Muropeptiden wurden 100 mg formamidextrahierter Zellwände in einer Lysozymlösung (10 mg Lysozym in 10 ml 0,1 M Ammonacetatpuffer pH = 6) suspendiert. Nach 24-stdg. Inkubationszeit bei 37 ° wurde die Suspension durch Zentrifugieren bei 15000 g in nicht gespaltenes Material und Lysat getrennt. Das Sediment wurde noch einmal 24 Stdn. mit frischer Lysozymlösung inkubiert und wiederum abzentrifugiert. Das Lysat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und die Puffersalze im Vakuumexsikkator über konz. Schwefelsäure und festem NaOH entfernt. Das salzfreie Lysat wurde in 10 ml 10-proz. TES aufgenommen und das dadurch ausgefällte Lysozym abzentrifugiert. Die TES wurde durch mehrmaliges Extrahieren mit Äther wieder entfernt, das Lysat erneut eingengt und dann auf Papier mit Lösungsmittel D getrennt. Die Spaltprodukte lassen sich nicht mehr durch Ninhydrin nachweisen, da die freien Aminogruppen durch die Formamid-Extraktion formyliert sind. Deshalb wurde die Laufstrecke des Lysates bis zur Höhe des zur Orientierung mit aufgetragenen Alanins in 8 gleiche Zonen unterteilt. Die Eluate der verschiedenen Zonen wurden hydrolysiert und entweder qualitativ durch zweidimensionale Papierchromatographie oder quantitativ mit Hilfe des Aminosäure-Analysators auf ihre Aminosäuren- und Aminosukkerzusammensetzung untersucht.

Die 8 Zonen des Lysates der Charge I enthielten nach der Hydrolyse alle im Murein vorkommenden Aminosäuren und Aminosucker, allerdings nahm die Intensität der Serin- und Asparaginsäureflecke der weiter gelaufenen Zonen (IV – VIII) merklich ab. Das deutet auf das Vorkommen von unvollständigen Muropeptiden hin, die allerdings auch durch eine partielle Hydrolyse bei der FA-Extraktion entstanden sein können.

Die 8 Zonen des Lysates der Charge II zeigten nach der Hydrolyse auf dem Papierchromatogramm ebenfalls alle im Murein vorkommenden Aminosäuren und Aminosucker. Hier wurden die kurz laufenden Zonen auch auf ihre quantitative Zusammensetzung untersucht (Tab. 3). Es zeigte sich, daß die Glutaminsäure im Verhältnis zu den anderen Aminosäuren und Aminosukern den „normalen“ Wert annimmt. Sie weist auch ausschließlich die D-Konfigu-

		Ala	Glu	Orn	Ser	Asp	GlcNH ₂	Mur
Charge I	Lysatzzone II	2,06	1,10	1,00	0,72	0,90	1,12	1,04
	Lysatzzone II	2,27	1,09	1,00	0,59	1,00	1,00	0,96
Charge II	Lysatzzone III	2,34	1,25	1,00	0,58	0,92	1,08	1,00
	Lysatzzone I A	2,50	1,30	1,00	0,50	0,72	1,21	1,36

Tab. 3. Molverhältnis der Aminosäuren und Aminosucker in verschiedenen Zonen der Papierchromatogramme von Lysozym-lysaten.

ration auf (Messung der ORD von DNP-Glutaminsäure).

Die große Menge an L-Glutaminsäure in der Zellwand ist also in den Lysozym-Spaltprodukten nicht mehr vorhanden. Sie wurde in dem von Lysozym nicht angegriffenen Sediment gefunden. Das nicht gespaltene Material wurde mit Wasser gewaschen, gefriergetrocknet und anschließend 16 Stdn. in 4 N HCl hydrolysiert. Der Rückstand ergab fast nur L-Glutaminsäure, außerdem verschiedene Aminosäuren, die aber jeweils nur etwa 3–10% des Glutaminsäurewertes erreichten. Von diesen Aminosäuren stammte wohl nur ein kleiner Teil aus dem Murein, denn die Menge an Muraminsäure betrug nur zwischen 0,1 und 1% der Glutaminsäure. Die Masse der Aminosäuren stammte wahrscheinlich aus einer Verunreinigung mit Protein, was sich auch daraus ergibt, daß neben den Aminosäuren des Mureins auch das ganze Spektrum der Protein-aminosäuren vorkam.

Die L-Glutaminsäure ist demnach kein Bestandteil des Mureins, sondern liegt vermutlich als Polyglutaminsäure vor, die nur unter bestimmten, von uns nicht näher definierbaren Wachstumsbedingungen gebildet wird. Auch andere Bifidobakterien zeigten Schwankungen in ihrem Glutaminsäuregehalt und auch dort ist die überschüssige Glutaminsäure kein Bestandteil des Mureins. Wir fanden dies sowohl beim früher beschriebenen Lys-Gly-Typ² als auch beim Orn-Ser-Ala-Thr-Ala-Typ¹³.

3. Bestimmung der Aminosäuresequenz mit Hilfe der Identifizierung der Peptide des Partialhydrolysates

Zur Bestimmung der Aminosäuresequenz wurde die tryptisch verdaute Zellwand 45 Min. im siedenden Wasserbad mit 4 N HCl hydrolysiert. Aus die-

sem Partialhydrolysat wurden durch wiederholte, eindimensionale Papierchromatographie in den Lösungsmitteln A und B die einzelnen Peptide isoliert. Abb. 1 gibt das Schema eines zweidimensionalen Chromatogramms des Partialhydrolysates wieder.

Abb. 1. Schema eines zweidimensionalen Chromatogramms eines Partialhydrolysates der Zellwand (ZW-Tryp). 1 = Lysin, 2 = Glutaminsäure, 3 = Alanin, 4 = Serin, 5 = Asparaginsäure, 6 = Glycin (stammt aus Verunreinigung), 7 = Muraminsäure, 8 = Glucosamin, 9–14 s. Tab. 4, 15 = Mur-Ala, 16 = Mur-Ala-D-Glu.

Tab. 4 zeigt eine Übersicht über die Analysenergebnisse der isolierten Peptide. Die normale Sequenz des an Muraminsäure gebundenen Tetrapeptides ist durch das Auftreten der Peptide Mur-L-Ala (Nr. 15), Mur-L-Ala-D-Glu (Nr. 16), L-Ala-D-Glu (Nr. 9), D-Glu-L-Orn (Nr. 10) und L-Orn-D-Ala (Nr. 11) bewiesen. Die Interpeptidbrücke zwischen dem C-terminalen D-Alanin und der δ -Aminogruppe des Ornithins wird durch die Aminosäuren D-Asparaginsäure und L-Serin gebildet. Die Bindung des Serins an die δ -Aminogruppe des Ornithins beweisen die Peptide δ -Ser-L-Orn (Nr. 12) und δ -L-Ser-L-Orn-D-Ala (Nr. 13). Das Peptid Nr. 12 ist außerordentlich hydrolysestabil, es ist selbst nach 16-stdg. Hydrolyse in 4 N HCl noch nicht vollständig gespalten. Das Peptid D-Ala-D-Asp (Nr. 14) beweist die Bindung der Asparaginsäure an das C-terminale D-Alanin. Dieses Peptid trennt sich in unseren Standard-Lösungsmitteln A und B kaum von dem Peptid Nr. 9. Die Zone dieses Peptidgemisches wurde deshalb mit dem Lö-

¹³ D. KOCH, K. H. SCHLEIFER u. O. KANDLER, Arch. Mikrobiol., im Druck [1970].

Peptid Nr.	R in den Systemen		Molverhältnis					DNP-Derivate	Konfig. d. Ala	Sequenz
	A	B	Glu	Ala	Orn	Ser	Asp			
9	0,89	0,25	1	1	—	—	—	DNP-Ala	L	L-Ala-D-Glu
10	0,11	0,24	1	—	1	—	—	DNP-Glu δ -DNP-Orn	—	D-Glu-L-Orn
11	0,31	0,53	—	1	1	—	—	Di-DNP-Orn	D	L-Orn-D-Ala
12	0,14	0,63	—	—	1	1	—	DNP-Ser α -DNP-Orn	—	δ -L-Ser-L-Orn
13	0,23	0,70	—	1	1	1	—	DNP-Ser α -DNP-Orn	—	—
14	0,86	0,24	—	1	—	—	1	DNP-Ala	D	D-Ala-D-Asp

Tab. 4. Daten zur Identifizierung verschiedener Peptide der Abbildung 1.

sungsmittel C mehrmals rechromatographiert. Dabei ergab sich eine Trennung der beiden Peptide (R_{Ala} Nr. 9 = 0,69 und R_{Ala} Nr. 14 = 0,45).

Im Partialhydrolysat der glutaminsäurereichen Zellwandcharge II traten zusätzlich Peptide auf, die nach der Hydrolyse als einzige Aminosäure Glutaminsäure enthielten. Diese Peptide sind wohl oligomere Glutaminsäuren aus der unbekannten lysozym-resistenten Zellwandkomponente. Es konnten keine Peptide gefunden werden, die neben L-Glutaminsäure noch eine zum Murein gehörende Aminosäure enthielten.

Da aus dem Partialhydrolysat das zu erwartende Peptid D-Asp-L-Ser nicht isoliert werden konnte, war es auch nicht möglich zu bestimmen, ob die α - oder β -Carboxylgruppe der Asparaginsäure an der Bindung beteiligt ist. Es wurde daher versucht, die Art der Bindung durch die Photolyse von DNP-Muropeptiden festzustellen¹⁴, bei denen Asparaginsäure N-terminal auftritt. Durch Spaltung mit Lysozym wurden derartige Muropeptide aus der DNP-Zellwand gewonnen. Das von Puffersalzen und Lysozym gereinigte DNP-Muropeptid blieb bei der papierchromatographischen Trennung im System E auf der Startlinie zurück und enthielt somit keine freien DNP-Aminosäuren, die das Ergebnis der photolytischen Spaltung verfälscht hätten.

Die Abb. 2 zeigt die Ergebnisse der Spaltung verschiedener DNP-Derivate mit UV-Licht. Ein Absinken der Extinktion bei 348 $m\mu$ und ein gleichzeitiges Ansteigen der Extinktion bei 284 $m\mu$ zeigt die photolytische Spaltung der DNP-Derivate an. Das ist bei DNP-Alanin und dem DNP-Muropeptid der Fall. Diese Substanzen müssen also eine der dinitrophenylierten Aminogruppe benachbarte, freie Carboxylgruppe besitzen. Im DNP-Muropeptid muß dem-

Abb. 2. Veränderungen der Extinktion verschiedener DNP-Derivate bei der UV-Bestrahlung. 1 = DNP-Alaninamid, 2 = DNP-Ala-Glu, 3 = DNP-Alanin, 4 = DNP-Muropeptid. a = Extinktionsänderung bei 348 nm, b = Extinktionsänderung bei 284 nm.

nach die Asparaginsäure mit ihrer β -Carboxylgruppe gebunden sein.

Dagegen ist bei dem Peptid DNP-L-Ala-D-Glu die der dinitrophenylierten Aminogruppe benachbarte Carboxylgruppe durch die Peptidbindung mit der Glutaminsäure „besetzt“ und beim dinitrophenylierten Alaninamid ist die Carboxylgruppe amidiert. Beide Verbindungen werden durch UV-Licht nicht gespalten, was durch gleichbleibende Extinktionswerte bei 348 $m\mu$ und 284 $m\mu$ angezeigt wird.

Im Hydrolysat (16 Stdn. 4 N HCl) eines aliquoten Teils der DNP-Muropeptide wurden alle zum Murein gehörenden Aminosäuren und Aminosucker sowie die DNP-Aminosäuren DNP-Asparaginsäure und, in geringer Menge, δ -DNP-Ornithin nachgewie-

¹⁴ H. R. PERKINS, Biochem. J. **102**, 29c [1967].

sen. Es handelte sich also um ein Gemisch von viel vollständigem Muropeptid mit Interpeptidkette und wenig unvollständigem ohne Interpeptidkette. Hydrolysate von DNP-Muropeptiden, die mit UV-Licht bestrahlt waren, enthielten an DNP-Derivaten nur noch das photostabile δ -DNP-Ornithin. DNP-Asparaginsäure war nicht mehr nachweisbar, dafür zeigte sich aber auf dem Chromatogramm 4-Nitro-2-nitrosoanilin als blaugrüner Fleck, wie es zu erwarten war, wenn die DNP-Asparaginsäure gespalten wurde.

Auf Grund der quantitativen Aminosäuren-Zusammensetzung der Zellwand, der bei der Partialhydrolyse freigesetzten Peptide und der Bestimmung der freien Aminogruppen der Zellwand kann das in Abb. 3 enthaltene Schema der Aminosäuren-

Abb. 3. Ausschnitt aus einem typischen Fragment des Mureins.

sequenz eines typischen Abschnittes des Mureins entworfen werden. Die Quervernetzung ist allerdings nur zu etwa 60% verwirklicht, da etwa 35% der Asparaginsäure und etwa 6% der δ -Aminogruppe des Ornithins frei sind. Das Fehlen von etwa 6% der Interpeptidketten erklärt auch die gegenüber Ornithin etwas niedrigeren Werte von Asparaginsäure und Serin. Der Überschuß an L-Alanin gegenüber D-Alanin sowie das Auftreten von C-terminalem Ornithin zeigen, daß neben Tetrapeptiden auch Tripeptide auftreten, bei denen das terminale D-Alanin fehlt.

Im Gegensatz zur β -Bindung der Asparaginsäure, die durch die Photolyse des DNP-Muropeptides di-

rekt bewiesen werden konnte, ist die γ -Bindung der D-Glutaminsäure nur in Analogie zu anderen Mureinen¹⁵ angenommen worden.

Das Auftreten von einem Mol NH₃ pro Mol Muropeptid spricht dafür, daß entweder Glutaminsäure oder Asparaginsäure amidiert sind. Die Photolysierbarkeit des DNP-Muropeptids zeigt, daß Asparaginsäure – zumindest die 35% der dinitrophenylierbaren und damit nicht quervernetzten Asparaginsäure – nicht amidiert ist. Daher kann in Übereinstimmung mit anderen Mureinen¹⁵ angenommen werden, daß auch bei *Bifidobacterium bifidum* Iso-glutamin vorliegt, wie es im Schema angegeben ist.

Diskussion

Der gleiche Mureintyp wie in Stamm ATCC 11863 wurde auch in den anderen 4 Stämmen von *B. bifidum* gefunden, die uns im Rahmen einer Untersuchung von mehr als 50 Stämmen von Bifidobacterien verschiedener Herkunft zur Verfügung standen. Es handelt sich bei den 4 Stämmen um zwei Eigenisolate aus dem Stuhl eines Säuglings und eines Erwachsenen, die auf Grund der verschiedenen physiologischen Merkmale eindeutig zu *B. bifidum* gehörten sowie um die beiden Stämme E 319 f und S 28 a, die uns von REUTER freundlicherweise überlassen und von ihm ebenfalls aus dem Stuhl eines Säuglings bzw. eines Erwachsenen isoliert und zu *B. bifidum* gestellt worden waren. Da keiner der zahlreichen anderen Stämme, die auf Grund ihrer physiologischen Merkmale zu anderen Arten gestellt wurden, den gleichen Mureintyp aufwies, kann man den Orn-Ser-Asp-Typ innerhalb der Gattung Bifidobacterium als charakteristisch für die Art *B. bifidum* ansehen.

Wie vorläufige Ergebnisse unseres Arbeitskreises zeigen, kommt dieser Typ wahrscheinlich auch außerhalb der Gattung Bifidobacterium bei den coryneformen Bakterien vor, die sich durch eine außerordentliche Vielfalt der Murein-Typen auszeichnen¹⁶. Bei *Corynebacterium manihot* NCIB 9097 und *Brevibacterium liticum* ATCC 15921 ergaben sich die gleichen Molverhältnisse der Aminosäuren und das gleiche Peptidmuster der Partialhydrolysate. Dagegen ist innerhalb der Familie der Milchsäurebakterien kein entsprechender Fall be-

¹⁵ J. M. GHUYSEN, Bacteriol. Reviews **32**, 425 [1968].

¹⁶ F. FIEDLER, K. H. SCHLEIFER, B. CZIHARZ, E. INTERSCHICK u. O. KANDLER, Folia mikrobiol. [Praha], im Druck [1970].

kannt, obwohl eine sehr große Zahl von Stämmen aus diesem Bereich analysiert wurde¹⁷. Wenn in diesem Bereich Asparaginsäure im Murein vorkommt, so handelt es sich immer um D-Isoasparagin, das direkt an die ϵ -Aminogruppe des Lysins bzw. die δ -Aminogruppe des Ornithins gebunden ist und allein die Interpeptidbrücke bildet.

Analoge Interpeptidbrücken wie in *B. bifidum*, die aus je einer Di- und Monocarbonsäure aufgebaut sind, wurden bisher in folgenden Fällen gefunden:

Bacillus pasteurii (β -Aspartyl-L-Alanin)¹⁸, *Micrococcus luteus* ATCC 398 (γ -L-Glutaminyl-

glycin)¹⁹, *Micrococcus freudenreichii* ATCC 407 (γ -L-Glutaminyl-L-Alanin)¹⁹, *Sarcina urea* ATCC 6473 (γ -D-Glutaminylglycin)¹⁸.

Dieses Prinzip der Interpeptid-Brückenbildung ist offensichtlich selten, aber in verschiedenen taxonomischen Einheiten der Bakterien verwirklicht.

Fräulein ELEONORE WEIDERMANN danken wir für ausgezeichnete technische Assistenz bei der Durchführung der Aminosäureanalysen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung einer Sachbeihilfe.

¹⁷ O. KANDLER, Int. J. Syst. Bacteriol., im Druck [1970].

¹⁸ H. RANFTL, K. H. SCHLEIFER u. O. KANDLER, Arch. Mikrobiol., im Druck [1970].

¹⁹ E. NIEBLER, K. H. SCHLEIFER u. O. KANDLER, Biochem. biophysic. Res. Commun. **34**, 560 [1969].