

### 36. Hans Pringsheim und Stefanie Lichtenstein: Über krystallisierte Polysaccharide aus Glykogen.

[Aus dem Chemischen und dem Physiologischen Institut der Universität Berlin.]

(Eingegangen am 14. Januar 1916.)

Vor etwas mehr als 10 Jahren ist es Franz Schardinger<sup>1)</sup> gelungen, die Stärke durch den von ihm entdeckten *Bacillus macerans* in einer bis daher unbekannten Weise abzubauen. Die krystallisierten Abbauprodukte dieses Vorganges sind inzwischen der Gegenstand eingehender Untersuchung gewesen, durch die festgestellt werden konnte, daß wir in Gestalt der Schardingerschen krystallisierten Dextrine und ihrer weiteren Abbauprodukte eine neue Klasse von Polysacchariden kennen gelernt haben<sup>2)</sup>. Die Rolle, welche diese Produkte im Bau des großen Stärkemoleküls spielen dürften, ist fernerhin Gegenstand der Erörterung gewesen<sup>3)</sup>. Das bemerkenswerteste Ergebnis der genannten Forschungen war, daß es sich bei der neuen Körperklasse um Polysaccharide mit Ringstruktur handelt, die durch Depolymerisation in niedermolekulare Verbindungen derselben Körperklasse übergehen können. Der fernere Schluß, daß derartige Depolymerisationen auch im Abbau der Stärke eine Rolle spielen dürften.

Verfolgt man diese Gedankengänge weiter, so kommt man bald zu der Fragestellung, ob man auch im Aufbau anderer Polysaccharide als der Stärke Polysaccharide mit Ringstruktur als Grundkomplexe annehmen kann. Um die Entscheidung dieser Frage auf eine experimentelle Grundlage zu stellen, mußte versucht werden, die in Frage kommenden Polysaccharide mit Hilfe des *Bacillus macerans* zu vergären und in der Gärflüssigkeit nach krystallisierten Abbauprodukten zu suchen. Von vornherein kommen hierfür nur in Wasser lösliche Polysaccharide in Frage, da die Vergärung unlöslicher wie z. B. der Cellulose durch den *Bacillus macerans* von vornherein aussichtslos erschien. Es wurde deshalb zuerst an das Inulin und den Salepschleim gedacht. Doch konnte bisher keine Vergärung dieser Kohlenhydrate durch den Schardingerschen *Bacillus* erzielt werden. Da es sich hier um Substanzen handelt, die nicht aus

<sup>1)</sup> Schardinger, Zentralbl. f. Bakt. und Parasitenkunde. II. Abt. 14, 722 [1905]; 19, 161 [1907]; 22, 98 [1909]; 29, 188 [1911].

<sup>2)</sup> H. Pringsheim und A. Langhans, B. 45, 2533 [1912]. H. Pringsheim und F. Eissler, B. 46, 295 [1913]; 47, 2565 [1914].

<sup>3)</sup> H. Pringsheim, Die landwirtschaftliche Versuchsstation 84, 267 [1914]. Die Naturwissenschaften 3, 95 [1915].

Glucose-Molekülen wie die Stärke, sondern aus Fructose- resp. Mannose-Molekülen aufgebaut sind, erscheint die Nichtangreifbarkeit durch den *Bacillus macerans* wenig verwunderlich, wenn man an die meist stark ausgeprägte spezifische Einstellung der Mikroorganismen auf ihr Substrat in Berücksichtigung zieht.

Hoffnungsvoller mußte es erscheinen, das Glykogen der beabsichtigten Vergärung zu unterwerfen. Dieses Polysaccharid steht der Stärke in verschiedenen Beziehungen am nächsten, nicht allein, daß es wie die Stärke ausschließlich aus Glucose-Molekülen aufgebaut ist, wir kennen in ihm auch die einzige Substanz, die wie die Stärke durch diastatische Fermente in Maltose gespalten wird, wobei der Abbau Zwischenstufen in Gestalt von Dextringemischen durchschreitet, die den amylolytischen Stärkedextrinen entsprechen. Fernerhin ist das Glykogen, wenn wir von einigen wenig erforschten Pilzgerüstsubstanzen absehen, auch das einzige Polysaccharid, welches mit Jod eine charakteristische Färbung gibt. Wenn diese Färbung auch der Blaufärbung der Jodstärke nicht entspricht, so korrespondiert sie doch genau mit der Färbung, welche Stärkedextrine einer gewissen Abbaustufe mit Jod ergeben. Das Glykogen zeigt keine Kleisterbildung wie die Stärke, aber seine Lösung in Wasser ist nie klar, sondern immer opaleszierend, so daß auch hierin eine gewisse Analogie zwischen den beiden Polysacchariden gefunden werden kann, die bei anderen nicht auftritt. Bemerken wir zum Schluß noch, daß das Glykogen dieselbe physiologische Rolle wie die Stärke spielt, daß es als Reservematerial im tierischen Organismus wie die Stärke im pflanzlichen gespeichert und zum Transport wie diese in Glucose abgebaut wird, so haben wir eine Menge Beispiele angeführt, die beweisen, daß in der Tat zwischen Glykogen und Stärke eine weit nähere Beziehung besteht als zwischen Stärke und irgend einem anderen bekannten hochmolekularen Kohlenhydrat.

Der Vergärung des Glykogens durch den *Bacillus macerans* wie auch der Isolierung der gebildeten Abbauprodukte stellten sich längere Zeit bedeutende Schwierigkeiten entgegen. Die erste Schwierigkeit war die Beschaffung eines geeigneten Glykogens. Es gibt im Handel kein reines Glykogen; das übliche Handelsprodukt enthält einen derartig hohen Prozentgehalt an anorganischen Bestandteilen, daß seine Verwendung für unsere Zwecke unmöglich war, denn bei der für die Isolierung der Abbauprodukte notwendigen Konzentration erhält man einen an Salzen so reichen Sirup, daß aus ihm weder durch Krystallisation, noch durch die bei der Stärke verwandte Methode der Fällung mit organischen Lösungsmitteln, wie Chloroform, etwas isoliert

werden kann. Schließlich hat uns die Firma Merck ein geeignetes Präparat geliefert. Dieses Produkt war so gut wie aschefrei; es enthielt noch einen geringen Prozentgehalt an Eiweiß, der beim Sterilisieren aus der wäßrigen Lösung in Gestalt dunkler Flocken ausfiel. Da sie jedoch durch Filtration entfernt und etwa in Lösung gebliebenes Eiweiß durch eiweißfällende Mittel herausgeholt werden konnte, spielte diese Verunreinigung für unsere Zwecke keine Rolle mehr.

Die Vergärung des Glykogens durch den *Bacillus macerans* ist weit schwieriger als die der Stärke. Von vornherein muß bemerkt werden, daß schon die Fortzüchtung des *Bacillus* auf Kartoffelkeilen keine so leichte Sache ist, wie man eigentlich annehmen sollte. Es schleichen sich auf dem für viele Bakterien geeigneten Züchtungsmaterial unvermutet Verunreinigungen ein, die nur mit Hilfe genauer mikroskopischer Kontrolle und gleichzeitiger Prüfung durch Anlegen von Agarplatten zu erkennen sind. Das Fortzüchten auf Kartoffelkeilen ist aber Vorbedingung für die Erhaltung der Gärkraft des *Bacillus macerans*; auf Agar oder Gelatine wird sie geschwächt, und erst durch neue Züchtung auf Kartoffel kann sie wieder aufgefrischt werden<sup>1)</sup>. Impft man eine Öse einer Kartoffelkultur in eine sterile Glykogenlösung, so gelingt es nicht, sie in Gärung zu versetzen. Dazu ist nötig, daß man einen ganzen frisch mit dem *Bacillus* bewachsenen Keil etwa in dem Zustande, in dem er zu zerfallen beginnt, in die Glykogenlösung überträgt, wie ja auch bei der Stärkegärung auf diese Weise geimpft wurde. Dieses Übertragen bringt immer gewisse Gefahren mit sich, bei der Stärke sind sie wenig gefährvoll, denn hier verläuft die Vergärung mit derartiger Kraft, die Entwicklung des *Bacillus macerans* ist eine so rapide, daß dadurch irgendwelche beim Übertragen des Keils in den Stärkekleister mitgezogene Luftkeime an der Entwicklung gehindert werden. Anders beim Glykogen: Die Vergärung verläuft hier sehr schleppend, sie muß mehrere Wochen ausgedehnt werden, ehe man den gewünschten Effekt erzielt; der Überwucherung durch Verunreinigungen ist also

<sup>1)</sup> Allerdings konnten wir in der letzten Zeit die Beobachtung machen, daß der *Bacillus macerans* beim Fortzüchten auf einem aus Rinderblut hergestellten Agarnährboden, auf dem er übrigens sehr gut wächst, nichts von seinem Gärvermögen einbüßt; ein mit einer Öse einer solchen Agarkultur geimpftes Kartoffelröhrchen zeigt schon am nächsten Tage dieselbe intensive Gasbildung mit nachherigem Zerfall des Kartoffelkeils wie beim Impfen aus einer gut entwickelten Kartoffelkultur. Ob diese Eigenschaft des *Bacillus macerans* beim Fortzüchten durch viele Generationen hindurch auf dem Agarnährboden erhalten bleibt, können wir noch nicht entscheiden.

eine günstige Gelegenheit geboten, die durch die in unserem Glykogen vorhandenen Spuren von Eiweiß noch gefördert wird. Wir haben uns aber durch Probenahme aus der Gärflüssigkeit und Anlegen von Agarplatten aus ihr davon überzeugt, daß uns am Ende die Glykogenvergärung in Reinkultur gelungen ist.

Das endliche Ergebnis unserer Untersuchung beweist, daß bei Vergärung durch den *Bacillus macerans* aus Glykogen dieselben Abbauprodukte wie aus Stärke gebildet werden. Der einzige Unterschied mag sein, daß das Dextrin  $\beta$ , die  $\beta$ -Hexaamylose, im Verhältnis zum Dextrin  $\alpha$ , der Tetraamylose, in größerer Menge entsteht, als bei der Stärke. Während bei Stärke auf 12 g Hexaamylose 70 g Tetraamylose erhalten wurden<sup>1)</sup>, gewannen wir auf 1.5 g Hexaamylose nur etwa 0.5 g Tetraamylose, das frühere Verhältnis von etwa 1 : 6 kehrt sich hier als zu 3 : 1 um. Doch dürfen aus diesem Befund keine besonderen Schlüsse auf die Beziehung der genannten Amylosen im Stärke- resp. Glykogenmolekül gezogen werden, da wir nicht wissen, ob der *Bacillus macerans* bei der Vergärung nicht aus dem Hexasaccharid Tetrasaccharid bilden kann. Jedenfalls wird die nahe Beziehung zwischen Stärke und Glykogen durch unser Gärungsresultat von neuem beleuchtet und bewiesen, daß auch der molekulare Aufbau dieser komplizierten Verbindungen in analoger Weise konstituiert sein muß.

Zum Hauptversuche standen uns 35 g Glykogen zur Verfügung. Sie wurden in zwei Teilen in 5-proz. wäßriger Lösung sterilisiert und mit je einer Kartoffelkultur des *Bacillus macerans* beimpft. Die Gärung setzte bei 37° ganz allmählich ein. Nach zwei Tagen beobachtete man das Aufsteigen der ersten Gasblasen. Dann verstärkte sich die Gasabgabe, so daß die in der Lösung vorhandenen Eiweißflocken an die Oberfläche der Gärflüssigkeit gehoben wurden. Dieses Stadium der Gärung dauerte etwa eine Woche, dann flaute sie wieder ab, bis nach 4 Wochen keine Gasabgabe mehr bemerkbar war. Die nun filtrierte Lösung wurde jetzt mit kolloidalem Eisenhydroxyd (nach Michaelis und Rona) gefällt und das Filtrat nach dem Absaugen und Waschen des Eisenniederschlags zusammen mit den Waschwässern im Vakuum bei 50° auf 10 ccm eingedampft. Bei der Vergärung des Glykogens bilden sich weit weniger nicht krystallinische Zwischendextrine als bei der der Stärke. Eine Ausfällung mit organischen Lösungsmitteln ist deshalb unnötig. Bei 24-stündigem Stehen im Eisschrank krystallisierte das Dextrin  $\beta$  direkt aus; es wurde scharf abgesaugt und war dann noch mit einer geringen Menge des auch hier

<sup>1)</sup> B. 46, 2960 [1913].

gebildeten »Schlamm«, der mutmaßlichen Octaamylose, vermengt. Das Produkt wurde deshalb nochmals in mehr Wasser, etwa 40 ccm, gelöst, der Schlamm nach eintägigem Stehen abfiltriert, die Lösung von neuem konzentriert und die nun reine  $\beta$ -Hexaamylose zurückgewonnen. Ausbeute 1.5 g.

#### Dextrin $\beta$ . Hexaamylose.

Nach dem Trocknen bei  $100^\circ$  und 15 mm über Phosphorpentoxyd analysierte die Substanz wie folgt:

0.1483 g Sbst.: 0.2368 g  $\text{CO}_2$ , 0.0850 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_6$  (972.48). Ber. C 44.45, H 6.18.

Gef. » 43.55, » 6.41.

Der Kohlenstoffwert liegt etwas niedrig, doch wurde die Substanz durch zwei weitere Bestimmungen identifiziert.

Zur optischen Bestimmung diente die Lösung in Wasser:

0.0856 g Sbst. Gesamtgewicht der Lösung 8.5942 g.  $d^{20}_D = 1.0055$ . Drehung bei  $20^\circ$  und Natriumlicht  $+1.58^\circ = 0.02^\circ$  (1-dm-Rohr). Mithin:  $[\alpha]^{20}_D = +157.8^\circ$ , frühere Werte  $+157.9^\circ + 158.3^\circ$ .

Die Substanz wurde ferner in ihr Brom-Additionsprodukt verwandelt.

Dibrom- $\beta$ -hexaamylose, orangefarbene Prismen.

0.1240 g Sbst.: 0.0414 g AgBr.

$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_6, 2\text{Br}$ . Ber. Br 14.13. Gef. Br 14.21.

Auch gab das Dextrin  $\beta$  beim Versetzen seiner wäßrigen Lösung mit Jodjodkaliumlösung die charakteristischen rotbraunen Prismen der  $\beta$ -Jod-Additionsprodukte.

Das Dextrin  $\alpha$  ließ sich bei der geringen Menge am besten über sein Jodadditionsprodukt isolieren, das beim Versetzen des Filtrates vom Dextrin  $\beta$  mit Jodjodkaliumlösung in den für diese Reihe charakteristischen, metallglänzenden, grünen Nadeln gewonnen wurde. Sie wurden nach dem Waschen mit Wasser in wäßriger Lösung mit Silbercarbonat zerlegt, das Jodsilber abfiltriert, das gelöste Silber mit Schwefelwasserstoff ausgefällt und sein Filtrat nun im Vakuum zur Trockne verdampft. Der Trockenrückstand wurde mit 10 ccm 96-proz. Alkohol übergossen, der Alkohol zum Sieden gebracht und bis zur Lösung tropfenweise heißes Wasser zugegeben. Bald krystallisierte aus der von neuem filtrierten Lösung die Tetraamylose. Ausbeute 0.5 g.

#### Dextrin $\alpha$ . Tetraamylose.

Die Substanz wurde im Vakuum bei 15 mm und  $100^\circ$  über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0.1367 g Sbst.: 0.2210 g CO<sub>2</sub>, 0.0790 g H<sub>2</sub>O.

(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>4</sub> (648.32). Ber. C 44.45, H 6.18.

Gef. » 44.09, » 6.46.

Zur optischen Bestimmung diente die Lösung in Wasser:

0.0518 g Sbst. Gesamtgewicht der Lösung 7.2075 g.  $d_{20} = 1.0050$ .  
Drehung bei 20° und Natriumlicht  $+1.00^\circ = 0.02^\circ$  (1-dm-Rohr). Mithin:  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +138.5°, frühere Werte +138.9° +138.6°.

Die Substanz wurde in ihr Brom-Additionsprodukt verwandelt.

Brom-tetraamylose, hellgelbe Nadeln.

0.0426 g Sbst.: 0.0154 g AgBr.

(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>4</sub>, 1½ Br. Ber. Br 15.61. Gef. Br 15.38.

Da wir nun unsere Glykogenlösung mit Kartoffelkeilen geimpft haben, die eine gewisse Menge Stärke enthalten, könnte der Einwand erhoben werden, daß die isolierten Produkte aus der so zugeführten Stärke stammen. Wenn die Menge der in den Kartoffelkeilen enthaltenen Stärke auch sicher nicht ausgereicht hätte, um uns die isolierten Amylosen zu geben, so haben wir uns doch durch einen Versuch von der Unhaltbarkeit einer derartigen Annahme überzeugen wollen. Zu dem Zwecke wurden 20 g Maltose in 5-prozentiger steriler Lösung mit einem Kartoffelkeil beimpft und bei 37° mehrere Wochen der Gärung überlassen. Die Gasabgabe war allerdings sehr gering, aber die Maltose-Gärkultur ließ doch den für die Gärungen des *Bacillus macerans* charakteristischen, vom gebildeten Aceton stammenden Geruch erkennen. Vor der Verarbeitung wurde sie wiederum genau mikroskopisch und bakteriologisch auf Reinheit geprüft. Die Verarbeitung geschah genau wie bei der Glykogengärung, aber selbst die äußerst feine Jodreaktion ließ keine Amylosen erkennen. Mit Phenylhydrazin konnte durch das Osazon noch die Anwesenheit einer bedeutenden Menge Maltose nachgewiesen werden. Eine Spaltung in Glucose war nicht eingetreten.

Durch diesen Versuch, wie frühere mit demselben negativen Ergebnis mit Glucose ausgeführte, wird auch dem Einwand begegnet, daß der *Bacillus macerans* etwa durch seine Tätigkeit aus niedrig molekularen Zuckern die Amylosen aufzubauen imstande wäre.

Die Leo-Gans-Stiftung hat uns die Beschaffung des Glykogens durch ihre Unterstützung erleichtert. Wir sprechen ihr zum Schluß unseren Dank aus.