

Über das Vorkommen von 2,3-Dihydroxybenzoesäure und ihrer Aminosäurederivate in Kulturmedien von *Klebsiella oxytoca*

HEINZ KORTH

Hygiene-Institut der Universität Köln (Direktor: Prof. Dr. G. Pulverer)

Eingegangen am 10. Dezember 1969

2,3-Dihydroxybenzoic Acid and its Amino Acid Derivatives in the Culture Medium of *Klebsiella oxytoca*

Summary. Strains of the species *Klebsiella oxytoca* growing on glucose or gluconate medium accumulate 2,3-dihydroxybenzoic acid, its serin and threonine derivative. These strains also accumulate two compounds exhibiting fluorescence under ultraviolet radiation. One of these is probably a phosphoric ester. The formation of both substances could be partially inhibited by the tryptophane.

Zusammenfassung. Es wurde gefunden, daß *Klebsiella oxytoca*-Stämme auf Glucose- oder Gluconat-haltigen Nährböden neben 2,3-Dihydroxybenzoesäure deren Serin- und Threoninderivat anhäufen. Von den zwei unter UV fluorescierenden Substanzen, die außerdem von diesen Stämmen gebildet werden, ist die eine wahrscheinlich ein Phosphorsäurederivat. Tryptophanzugabe zu den Kulturmedien hinderte die Bildung dieser Substanzen zum Teil.

In einer früheren Mitteilung (Korth, Ørskov u. Pulverer, 1969) wurde über eine Anzahl von *Klebsiella*-Stämmen berichtet, die auf Gluconatböden mit Eisencitrat blaue bis braune Farbstoffe bilden und deren flüssige Kulturen unter UV eine stark blaue Fluorescenz aufweisen. Diese Stämme hatten zum überwiegenden Teil die Merkmale der *Oxytoca*-Variante der *Klebsiella*-Gruppe (*Klebsiella oxytoca*). In der vorliegenden Arbeit wird der Ursache der Farbstoffbildung nachgegangen.

Material und Methoden

Organismen und Nährböden. Für die Versuche wurden 2 *Klebsiella*-Teststämme benutzt, die aus der Sammlung der Kapseltypen von Frau Dr. Ørskov (Statens Seruminstitut Copenhagen, Internationale Escherichia-Zentrale) stammten (Korth, Ørskov u. Pulverer, 1969) und mit Nr. 29 und Nr. 46 bezeichnet waren. Sie wurden auf folgendem Nährboden gezogen: 20 g Glucose, 1 g Ammoniumsulfat, 4 g Kaliumdihydrogenphosphat und 1 g Magnesiumsulfat (7 H₂O), Aqua dest. ad 1000 ml, pH 7,2.

Die Lösung wurde in Portionen von je 250 ml auf 1 l-Rundkolben verteilt und nach Sterilisieren (zweimaliges Dampfen) und Beimpfen von festen Kulturen 3 Tage unter intensivem Rühren bei 22°C bebrütet.

Extraktion der mit Fe(III) anfärbaren Säuren: Die Kulturlösung wurde mit Salzsäure auf pH 3 gebracht, die Bakterien wurden abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit mit Ammoniumsulfat gesättigt und mit Essigester ausgeschüttelt. Die abgetrennte Esterschicht wurde mit wenig Natriumbicarbonatlösung extrahiert und die abgetrennte Bicarbonatlösung wieder nach Ansäuern auf pH 3 und Sättigen mit Ammoniumsulfat mit Essigester ausgeschüttelt. Der Essigester mit den so gereinigten Säuren wurde nach dem Trocknen abgedampft.

Papierchromatographie. Es wurde aufsteigend an dem Papier 2043 b Mgl der Fa. Schleicher & Schüll chromatographiert. Als Laufflüssigkeit dienten: 1. Partridge-Gemisch, n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 (obere Schicht); 2. Benzol-Eisessig-Wasser 125:72:3 (Smith, ref. bei Pittard u. Mitarb., 1961); 3. Methanol-n-Butanol-Benzol-Wasser 2:1:1:1 (Mason u. Berg, ref. bei Pittard u. Mitarb., 1961). Die unter UV fluoreszierenden Flecken wurden mit Hilfe der Analysenquarzlampe der Quarzlampengesellschaft Hanau markiert. Auf o-Dihydroxybenzoesäuren oder deren Aminosäurederivate wurde mit 1%iger Eisencitratlösung gesprüht. Um die Flecken deutlicher zu machen, wurde das Papier nach dem Sprühen kurz Ammoniakdämpfen ausgesetzt. Als Sprühreagentien auf Aminosäuren dienten: 1. 2% Ninhydrin in Methanol oder das fertige Sprühreagens von Merck; 2. Folin Reagens, Sprühlösung nach Mütting; 3. Nessler's Reagens für Hydroxyaminosäuren. Die beiden zuletzt genannten Reagentien wurden nach der Vorschrift hergestellt und benutzt, wie sie in der Broschüre „Chromatographie“ der Fa. E. Merck, Darmstadt, beschrieben wurde. Von derselben Firma stammten alle hier benutzten Reagentien bis auf 2,3-Dihydroxybenzoesäure und Protocatechusäure, welche die Fa. Fluka lieferte.

Hydrolyse. Zur Spaltung der Acylaminosäuren wurden etwa 10 mg Substanz in Einschmelzröhrchen 12 Std auf 100°C gehalten. Der Inhalt wurde danach zur Trockne eingedampft, wieder in etwas Wasser aufgenommen, filtriert und wieder eingengt.

Hemmversuche. Versuche zur Wachstumshemmung durch Adenosin wurden in einer Konzentration von 300 mg/1000 ml vorgenommen (Moyed, 1964). Außerdem wurden mit kaltgesättigter Adenosinlösung getränkte Testblättchen auf Glucose- oder Gluconatplatten gelegt und die Hemmhofbildung wurde beobachtet. Die Hemmwirkung aromatischer Aminosäuren auf die Bildung der o-Diphenolderivate und der unter UV fluoreszierenden Substanzen wurde in einer Konzentration von 10^{-3} mM/ml getestet (Gibson u. Mitarb., 1962).

Ergebnisse

Es wurden 2 Gruppen von Substanzen gefunden:

1. Die Serin- und Threoninderivate der 2,3-Dihydroxybenzoesäure mit sehr schwacher bläulicher Fluoreszenz unter UV; daneben in geringer Menge freie 2,3-Dihydroxybenzoesäure.

2. Zwei unter UV sehr stark hellblau fluoreszierende Substanzen, die sich im Unterschied zur ersten Gruppe nicht mit Eisen-III-Salzen anfärben ließen und deren eine bei der Alkalibehandlung Phosphorsäure abspaltete.

Die Auftrennung des Gemisches und die Bestimmung der Substanzen der ersten Gruppe wurde mit Hilfe der Papierchromatographie vorgenommen. Dazu wurde zuerst die Laufflüssigkeit 2 (Benzol-Eisessig-Wasser) benutzt, die schon Pittard u. Mitarb. (1961) zur chromatogra-

phischen Auftrennung der Hydroxybenzolderivate und der Substanz „M“ (sie erwies sich später als 2,3-Dihydroxybenzoylserin, Brot u. Mitarb., 1966; Young u. Mitarb., 1967) gebrauchten. Auf die Anfärbung mit Eisencitrat erschienen 2 Flecke:

1. $R_f = 0,15-17$ (intensiv) 2. $R_f = 0,65$ (schwach).

Die Flecken mit dem R_f -Wert 0,15–17, die schon ohne Anfärbung durch ihre schwach blaue Fluoreszenz unter der UV-Lampe kenntlich waren, wurden ausgeschnitten, eluiert und hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde parallel zum Eluat mit der gleichen Laufflüssigkeit chromatographiert: Während das Eluat wieder nur den Flecken bei $R_f = 0,15-17$ zeigte, erschien bei dem Hydrolysat nur ein starker Flecken bei 0,65, in der gleichen Höhe wie der schwache Fleck 2 des Ausgangsmaterials. Das Ausgangsmaterial und das Hydrolysat wurde nun mit dieser und den beiden anderen genannten Laufflüssigkeiten parallel zu Protocatechusäure und zu 2,3-Dihydroxybenzoesäure chromatographiert. Es wurde auf diese Weise nur 2,3-Dihydroxybenzoesäure gefunden.

Das Hydrolysat und das Eluat wurden weiterhin mit Patridge-Gemisch als Laufflüssigkeit parallel zu den beiden Aminosäuren Serin und Threonin chromatographiert. Während sich das Eluat nicht anfärbte, konnten in dem Hydrolysat zwei dicht aufeinanderfolgende Flecke nach Anfärben mit den oben genannten Aminosäuren-Reagentien getestet werden, die die gleiche Laufzeit wie die genannten Aminosäuren hatten und sich auch mit Nessler's Reagens als Spezialsprühmittel für Oxyaminosäuren anfärben ließen.

In dem Essigesterextrakt wurde noch eine zweite Gruppe von Substanzen gefunden, die sich nicht mit Eisencitrat anfärben ließen, aber unter UV stark hellblau fluorescierten. Zur Extraktion dieser Substanzen wurde Stamm 29 herangezogen, der diese Substanzen reichlicher lieferte als Stamm 46, dagegen aber weniger Stoffe der ersten Gruppe ablagerte. Auch diese Substanzen ließen sich gut papierchromatographisch mit der Laufflüssigkeit 2 trennen und hatten R_f -Werte von 0,95 und 0,85. Beide Flecken wurden gesondert eluiert und lieferten nicht kristallisierende gelbliche Öle. Aus vorläufigen Versuchen (Alkalisplaltung) zu schließen, spaltet die Substanz von $R_f = 0,95$ Phosphorsäure ab.

Die Bildung der durch Eisencitrat anfärbbaren Stoffe und auch die der unter UV fluorescierenden Substanzen konnte durch Tryptophan stark gehemmt werden. Parallelversuche mit Tyrosin und Phenylalanin zeigten, daß diese beiden Aminosäuren keine Wirkung auf die Ablagerung der genannten Substanzen hatten. Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde durch alle drei Aminosäuren nicht beeinflußt. Dagegen übte Adenosin schon in einer Konzentration von 300 mg/1000 ml eine starke

Hemmung auf das Wachstum der Keime aus. Bei Versuchen mit Testblättchen, die in eine kalt gesättigte Adenosinlösung getaucht worden waren, wurde beobachtet, daß Blättchen, die in die Mitte einer Glucose- oder Gluconatplatte gelegt waren, einen Hemmhof zeigten, der sich fast über die ganze Platte erstreckte.

Den Versuchen zur Aufklärung der Substanzen der ersten Gruppe und den vorläufigen Versuchen mit den unter UV fluoreszierenden Stoffen gingen Untersuchungen zur Schaffung eines Nährbodens voraus, der diese Stoffwechselprodukte in optimaler Ausbeute entstehen läßt:

Der in der vorausgegangenen Mitteilung genannte Boden zur Unterscheidung von Klebsiellen, die o-Diphenolderivate ablagern, von denen, die dazu nicht in der Lage sind, enthielt u. a. Gluconat als einzige Kohlenstoffquelle, Eisen-III-ionen als Indicator und sehr viel Stickstoff (1% Ammoniumsulfat). Er wurde ursprünglich zur Differenzierung Phenazinderivate anhäufender Pseudomonaden entwickelt. Der hohe Stickstoffgehalt konnte für die vorliegenden Zwecke ohne Nachteil auf 0,1% reduziert werden. Gluconat wurde durch Glucose ersetzt und Eisen wurde fortgelassen. Beides erhöhte die Ausbeute an o-Diphenolderivaten. Auch unterblieb die Braunfärbung, die offensichtlich zu einer geringeren Ablagerung der gesuchten Substanzen führte. Vorteilhaft wirkte sich auch die Herabsetzung der Bebrütungstemperatur von 37°C auf 22°C aus.

Diskussion

2,3-Dihydroxybenzoesäure und ihr Serinderivat spielen anscheinend im Stoffwechsel verschiedener Bakterien eine wesentliche Rolle. 1961 wurden diese beiden Verbindungen von Pittard u. Mitarb. (neben Protocatechusäure, Brenzcatechin und p-Oxybenzoesäure) aus den Umsatzprodukten gewaschener Zellen Tryptophan- und Tyrosin-auxotropher *Aerobacter*-Stämme, die in einem Glucose-Mineralsalzmedium suspendiert waren, gewonnen. Durch Tryptophanzugabe konnte die Anhäufung dieser Substanzen bei Tryptophan-auxotrophen Stämmen gehemmt werden, jedoch nicht bei Tyrosin-auxotrophen (Pittard u. Mitarb., 1962). Young u. Mitarb. (1967) fanden, daß Zugabe von 2,3-Dihydroxybenzoesäure selber keine Feed-back-Hemmung der entsprechenden Enzyme bewirkt und daß Eisenionen die Bildung dieser Verbindung hemmen. Bei weiteren Versuchen dieser Autoren mit Aromaten-auxotrophen *Aerobacter*- und *Coli*-Stämmen wurden auch solche aufgefunden, für die 2,3-Dihydroxybenzoesäure und deren Serinderivat Wachstumsfaktoren waren. Der Syntheseweg dieser Säure, der sich von der Chorisminsäure abzweigt und über Isochorisminsäure und Dihydro-2,3-dihydroxybenzoesäure führt, ist mit der Isolierung auch des vorletzten Intermediärproduktes gesichert (Young u. Mitarb., 1968). Eine Anhäufung freier 2,3-Dihydroxy-

benzoesäure ist inzwischen bei mehreren Bakterien und Pilzen gefunden worden. Ratledge (1967) berichtet, daß auch *Aerobacter aerogenes* in chinasäurehaltigem Nährboden unter Eisenmangel 2,3-Dihydroxybenzoesäure neben Protocatechusäure und Brenzcatechin abgelagert. Die Ablagerung der Aminosäurederivate dieser Säure ist aber erst in drei Fällen bekannt geworden. Das Serinderivat wurde außer den schon erwähnten Aromatenauxotrophen *Aerobacter*-Stämmen nur noch von einem Methionin-B₁₂-auxotrophen Stamm von *E. coli*, das Glycinderivat von einem Stamm von *Bacillus subtilis* bei Wachstum unter Eisenmangel gebildet und abgelagert (Brot u. Mitarb., 1966; Ito u. Neilands, 1958; Zusammenstellung bei Pittard u. Gibson, 1968).

Zwar war, wie schon erwähnt, auch bei unseren Stämmen die Hemmung der Anhäufung dieser Substanzen durch Eisenionen merklich, jedoch noch ausgeprägter war die Hemmung nach Tryptophanzugabe, während Phenylalanin und Tyrosin ohne Einfluß waren. Diese Hemmung durch Tryptophan wurde, wie bereits erwähnt, von Pittard u. Mitarb. (1962) bei Tryptophan-auxotrophen, nicht dagegen bei Tyrosin-auxotrophen *Aerobacter*-Stämmen nachgewiesen und als ein Hinweis auf einen Zusammenhang mit der Tryptophansynthese gedeutet. In diesem Zusammenhang ist es vielleicht bemerkenswert, daß die hier untersuchten *Klebsiella*-Stämme im Gegensatz zu den *Klebsiellen*, die keine o-Diphenolderivate anhäufen, die Fähigkeit besitzen, Tryptophan zu Indol abzubauen.

Im gleichen Maße wie die Bildung der Dihydroxybenzoesäurederivate wurde auch die der unter UV fluoreszierenden Stoffe durch Tryptophan gehemmt. Da im Verlaufe vorläufiger Versuche aus einer dieser Substanzen Phosphorsäure abgespalten werden konnte, lag es nahe, an die von Moyed (1964) aus Adenosin-gehemmten *Aerobacter*-Stämmen isolierte fluoreszierende Substanz zu denken. Die Fluoreszenz ließ sich in unserem Falle jedoch weder durch Adenosin verstärken noch durch Thiamin hemmen.

Frau Dr. I. Ørskov, Statens Seruminstitut Copenhagen, sei für die Überlassung der Stämme herzlich gedankt.

Frl. M. Ringhausen danke ich sehr für die fleißige Mithilfe bei diesen Untersuchungen.

Literatur

- Brot, N., Godwin, J.: Regulation of 2,3-Dihydroxybenzoylserine Synthetase by Iron. *J. biol. Chem.* **243**, 510—513 (1968).
 — — Fales, H.: In vivo and in vitro Formation of 2,3-Dihydroxybenzoylserine by *Escherichia coli* K-12. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **25**, 454—461 (1966).
 Gibson, F., Pittard, J.: Pathways of Biosynthesis of Aromatic Amino Acids and Vitamines and their Control in Microorganisms. *Bact. Rev.* **23**, 465—492 (1968).

- Ito, T., Neilands, J. B.: Products of low iron fermentation with bacillus subtilis: Isolation, characterisation and synthesis of 2,3-Dihydroxybenzoylglycine. J. Amer. Chem. Soc. **80**, 4645—4647 (1958).
- Korth, H., Ørskov, I., Pulverer, G.: Farbstoffbildende *Klebsiella*-Stämme. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. **211**, 105—107 (1969).
- Moyed, H. S.: Inhibition of the biosynthesis of the pyrimidine portion of thiamine by adenosine. J. Bact. **88**, 1024—1029 (1964).
- Pittard, A. J., Gibson, F., Doy, C. H.: Phenolic compounds accumulated by washed cell-suspensions of a tryptophan auxotroph of *Aerobacter aerogenes*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **49**, 485—494 (1961).
- — — A possible relationship between the formation of o-Dihydric phenols and tryptophan biosynthesis by *Aerobacter aerogenes* Biochim. biophys. Acta (Amst.) **57**, 290—298 (1962).
- Ratledge, C.: The production of an N-Acylanthranilic acid from shikimic acid and the effect of iron deficiency of the biosynthesis of other aromatic compounds by *Aerobacter aerogenes*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **141**, 55—63 (1967).
- Young, I. G., Batterham, T., Gibson, F.: Isochorismic acid: a new intermediate in the biosynthesis of 2,3-Dihydroxybenzoic acid. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **165**, 567—568 (1968).
- Cox, G. B., Gibson, F.: 2,3-Dihydroxybenzoate as a bacterial growth factor and its route of biosynthesis. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **141**, 319—331 (1967).

Dr. Heinz Korth
Hygiene-Institut der Universität
5000 Köln 41, Fürst Pückler-Str. 56