

Peptidoglycantyp und Zusammensetzung der Zellwandpolysaccharide von *Cellulomonas cartalyticum* und einigen coryneformen Organismen

Erko Stackebrandt¹, Franz Fiedler² und Otto Kandler^{2*}

¹ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Teilsammlung München, Menzinger Str. 67, D-8000 München 19, Bundesrepublik Deutschland

² Botanisches Institut der Universität München, Menzinger Str. 67, D-8000 München 19, Bundesrepublik Deutschland

Peptidoglycan Type and Cell Wall Polysaccharide Composition of *Cellulomonas cartalyticum* and Some Coryneform Organisms

Abstract. *Cellulomonas cartalyticum* was found to contain a peptidoglycan type different from that of the other species of *Cellulomonas*. The diamino acid is lysine instead of ornithine and the interpeptide bridge consists of D-Asp-D-Ser. The same peptidoglycan type occurs in *Corynebacterium manihot*, *Brevibacterium liticum* and *Arthrobacter luteus*. These non cellulolytic organisms are most likely not closely related with *Cellulomonas cartalyticum*, as indicated by the very different G + C content of their DNA, although they formed a narrow cluster including *C. cartalyticum* when numeric taxonomical methods were applied.

Key words: *Cellulomonas cartalyticum* – *Arthrobacter luteus* – *Corynebacterium manihot* – *Brevibacterium liticum* – Peptidoglycan type – Cell wall polysaccharides.

Die erst kürzlich im Zusammenhang mit der Herstellung von Einzellerprotein aus Zellulose neu beschriebene Art *Cellulomonas cartalyticum* (Carta, 1973) erwies sich zwar stoffwechselphysiologisch als recht ähnlich mit den übrigen Arten der Gattung (Stackebrandt u. Kandler, 1973), ließ sich aber aufgrund numerisch taxonomischer Untersuchungen (Seiler et al., 1977) nicht gemeinsam mit den anderen Arten gruppieren, sondern wies engere Beziehungen zu *Corynebacterium manihot*, *Brevibacterium liticum* und *Arthrobacter luteus* auf. Vorläufige Untersuchungen des Peptidoglycans dieser drei coryneformen Organismen (Fiedler et al., 1970; Cziharz, 1969) hatten ergeben, daß dieser

Peptidoglycantyp wahrscheinlich weitgehend mit dem von *Bifidobacterium bifidum* (Koch et al., 1970; Veerkamp, 1971) identisch ist, wenn man vom Ersatz des L-Ornithins bei *B. bifidum* durch L-Lysin bei den coryneformen Organismen absieht. Als Interpeptidbrücke dient bei diesem Peptidoglycan vermutlich das Peptid D-Asp-Ser (Konfiguration des Serins noch nicht bestimmt), während das Peptidoglycan der bisher untersuchten Arten von *Cellulomonas* nur einen Aminosäurerest, nämlich D-Glutaminsäure oder D-Asparaginsäure in der Interpeptidbrücke enthält. Da von *C. cartalyticum* noch keine Zellwandanalysen vorliegen, wurden die Zellwände dieser Art zusammen mit denen der drei genannten coryneformen Organismen vergleichend untersucht. Außerdem wurde zur weiteren Klärung der taxonomischen Stellung dieser Stämme auch der G + C-Anteil der DNA bestimmt.

Material und Methode

Organismen. *Corynebacterium manihot* DSM 20155 (NCIB 9097) und *Cellulomonas cartalyticum* DSM 20106 (ATCC 21681) erhielten wir von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Abt. München, *Arthrobacter luteus* ATCC 21606 und *Brevibacterium liticum* ATCC 15921 wurden von der ATCC, Maryland/U.S.A., bezogen.

Kulturbedingungen. Anzucht und Ernte der Zellen wurde wie von Fiedler u. Kandler (1973) beschrieben, durchgeführt.

Präparative und chemische Methoden. Die Präparation, Dinitrophenylierung und Hydrolyse der Zellwände, die Bestimmung der Aminosäuren sowie die chromatographischen Methoden wurden nach den Angaben von Schleifer u. Kandler (1972) durchgeführt. Die Konfigurationsbestimmung von Serin erfolgte mit Hilfe der D-Aminosäureoxydase nach den Angaben von Larson et al. (1971), die von Asparaginsäure wurde mit Hilfe der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Bergmeyer u. Bernt, 1970) durchgeführt. Die Bestimmung der Zuckerzusammensetzung erfolgte papier- und gaschromatographisch (Fiedler u. Kandler, 1973).

DNS wurde aus den mit Glasperlen zerschlagenen Zellen nach den Angaben von Marmur (1961) isoliert. Die Bestimmung des Schmelzpunktes der DNS wurde nach den Angaben von Marmur u. Doty (1962), die Berechnung des G + C Gehaltes der DNS nach De Ley (1970) durchgeführt.

* Adresse für Sonderdruck-Anfragen

Tabelle 1. Übersicht über die Molverhältnisse der Aminosäuren und Aminosucker der Zellwandpräparationen vor und nach der Dinitrophenylierung

Art		μMol Glu/mg Zellwand	Molverhältnis								
			Glu	Ala	Lys	Asp	Ser	Mur	GlcNH ₂	GalNH ₂	NH ₃
<i>Cellulomonas cartalyticum</i>	a	0,32	1,0	1,78	0,9	0,88	0,78	0,75	0,87	—	1,16
	b	—	1,0	1,70	0,82	0,58	0,81	1,04	1,12	—	1,29
<i>Corynebacterium manihot</i>	a	0,29	1,0	1,91	0,99	0,92	0,88	0,86	0,96	0,32	1,54
	b	—	1,0	1,79	0,85	0,59	0,85	1,0	1,06	0,31	1,22
<i>Brevibacterium liticum</i>	a	0,34	1,0	1,87	0,98	0,91	0,88	0,9	1,20	0,23	1,6
	b	—	1,0	1,74	0,88	0,63	0,86	1,10	1,23	0,19	1,45
<i>Arthrobacter luteus</i>	a	0,35	1,0	1,77	1,0	0,92	0,88	0,85	0,83	—	1,18
	b	—	nicht bestimmt								

a = vor, b = nach Dinitrophenylierung der Zellwandpräparationen

Reagentien. D-Aminosäureoxydase (5 mg/ml), Malat-Dehydrogenase (5 mg/ml), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (2 mg/ml), FAD, NADH und α-Ketoglutarat wurden von Boehringer GmbH, Mannheim, bezogen.

Ergebnisse

1. Analyse der Peptidoglycanstruktur

Die Aminosäureanalyse der Totalhydrolysate der Zellwandpräparationen aller 4 Organismen (Tabelle 1) ergab folgendes Molverhältnis der ninhydrinpositiven Verbindungen (gerundete Zahlen):

Glu: Ala: Lys: Asp: Ser: Mur: GlcNH₂: NH₃
= 1:2:1:1:1:1:1–1,2:1.

Im Falle von *Corynebacterium manihot* und *Brevibacterium liticum* waren außerdem noch rd. 0,3 Mol Galaktosamin pro Mol Glutaminsäure vorhanden, die aber sicher nicht ein Bestandteil des Peptidoglycans sind, sondern eine Komponente der Polysaccharide darstellen. Die Konfigurationsbestimmung durch Inkubation der Hydrolysate mit D-Aminosäureoxydase bzw. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase ergab, daß Serin bzw. Asparaginsäure praktisch vollständig, Alanin knapp zur Hälfte in der D-Form vorliegen. Die Konfiguration der Glutaminsäure und des Lysins wurden nicht bestimmt, da sie in Analogie zu allen anderen bekannten Peptidoglycantypen (Schleifer u. Kandler, 1972) mit Sicherheit in der L-Form vorliegen dürften und die Partialhydrolyse auch die entsprechenden Peptide, deren Positionen auf den Papierchromatogrammen von der Konfiguration der Einzelkomponenten abhängt, ergab.

Zur Überprüfung, ob nicht nur die Gesamtzusammensetzung des Peptidoglycans der 4 Organismen untereinander und mit dem von *Bifidobacterium bifidum* (allerdings L-Ornithin statt L-Lysin) identisch ist,

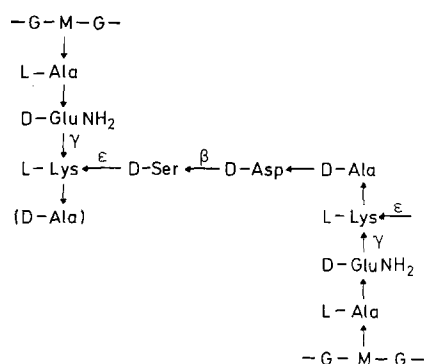


Abb. 1. Ausschnitt aus der Primärstruktur des Peptidoglycans von *Cellulomonas cartalyticum*, *Corynebacterium manihot*, *Brevibacterium liticum* und *Arthrobacter luteus*. G, N-Acetylglucosamin, M, N-Acetylmuraminsäure. (D-Ala) = nicht an allen Peptiduntereinheiten vorhanden

sondern auch die Primärstruktur, wurden Partialhydrolysate aller Zellwandpräparationen angefertigt und die Peptidmuster nach zweidimensionaler Papierchromatographie mit denen von *B. bifidum* (Koch et al., 1970) verglichen. Es ergab sich vollständige Identität.

Die für die Charakterisierung der Art der Quervernetzung besonders wichtigen Peptide N⁶-D-Ser-L-Lys, N⁶-D-Ser-L-Lys-D-Ala und D-Ala-D-Asp wurden isoliert und durch Aminosäureanalyse auf ihre Identität überprüft. Aufgrund dieser Ergebnisse und in Analogie zu allen bisher analysierten Peptidoglycantypen liegt die in der in Abbildung 1 wiedergegebene Primärstruktur vor.

2. Quervernetzungsgrad

Der Grad der Quervernetzung wurde durch die Bestimmung der freien Aminogruppen der Peptidoglycane

von 3 Organismen bestimmt. Wie die Aminosäureanalyse der Hydrolysate der dinitrophenylierten Peptidoglycane zeigt (Tabelle 1), ist der Gehalt an Asparaginsäure rd. 30 % niedriger als der vor der Dinitrophenylierung, d. h. 30 % der möglichen Quervernetzungen über die Interpeptidbrücken sind nicht realisiert. Außerdem nimmt auch der Gehalt an Lysin um rd. 10 % ab. Zusammen mit dem Befund, daß die Molverhältnisse für die Interpeptidbrückenkomponenten Serin und Asparaginsäure auch schon vor der Dinitrophenylierung rd. 10 % unter dem theoretischen Wert 1,0 liegen, spricht dies dafür, daß rd. 10 % der Lysinreste nicht mit einer Interpeptidbrücke substituiert sind und daher eine freie Aminogruppe tragen. Insgesamt dürften damit rd. 40 % der Peptiduntereinheiten nicht quervernetzt sein.

Entsprechend der unvollständigen Quervernetzung sollten rd. 40 % der Peptiduntereinheiten noch D-Ala-D-Ala Sequenzen tragen, und das Molverhältnis für die Gesamttalaninmenge über 2,0 liegen. Daß dieses Verhältnis tatsächlich nur bei 1,9 liegt und daß bei der Partialhydrolyse kein D-Ala-D-Ala gefunden wurde, spricht dafür, daß von den nicht quervernetzten Peptiduntereinheiten durch die D,D-Carboxypeptidase das terminale D-Alanin vollständig und durch die L,D-Carboxypeptidase das subterminale D-Alanin teilweise abgespalten wurden. Dies ist bei der Darstellung der Primärstruktur (Abb. 1) berücksichtigt.

3. Zellwandpolysaccharide

Aus einem Glutaminsäuregehalt der 4 Organismen von rd. 0,3–0,35 µMol/mg Zellwand und einem Molgewicht der substituierten Disaccharideinheiten (Muropeptide) des Peptidoglycans von rd. 1100 ergibt sich ein Peptidoglycangehalt der Zellwandpräparationen von rd. $\frac{1}{3}$ der Trockensubstanz. Der Rest besteht neben Asche vorwiegend aus Polysacchariden. Für Teichonsäuren hatten sich keine Hinweise ergeben (geringer Phosphatgehalt, Fehlen von Glycerin und Ribit im Hydrolysat). Die Zuckerzusammensetzung der Polysaccharide wurde von 3 Stämmen durch papier- und gaschromatographische Analyse der Zellwandhydrolysate (3 h, 2 N Trifluoressigsäure, 100° C) bestimmt.

Wie die Tabelle 2 zeigt, enthalten alle 3 Stämme Galaktose, aber keine Arabinose. Das bei Corynebakterien weit verbreitete Arabinogalaktan (Barksdale, 1970) liegt demnach nicht vor. *C. cartalyticum* weist neben Galaktose eine erhebliche Menge an Rhamnose auf, während *C. manihot* Galaktosamin und *B. liticum* ebenfalls Galaktosamin, aber zusätzlich noch etwas Glucosamin enthält. Daß das Zellwandpolysaccharid aus *Brevibacterium liticum* Glucosamine enthält, kann aus dem Molverhältnis (N-Acetylglucosamin/Glut-

Tabelle 2. Übersicht über die Zucker und Aminosukkerzusammensetzung der Zellwandhydrolysate. (+) = nur geringe Mengen

Species	Gal	Fuc	Rha	GlcNH ₂	GalNH ₂
<i>Cellulomonas cartalyticum</i>	+	+	+	–	–
<i>Corynebacterium manihot</i>	+	–	–	–	+
<i>Brevibacterium liticum</i>	+	–	–	(+)	+

Tabelle 3. G + C-Gehalt der DNS

Species	G + C (%)
<i>Cellulomonas cartalyticum</i>	76
<i>Corynebacterium manihot</i>	54
<i>Arthrobacter luteus</i>	55

aminsäure) geschlossen werden, das deutlich über 1,0 liegt; würde N-Acetylglucosamin nur als Komponente des Peptidoglycans auftreten, so läge das Molverhältnis wegen der bei der Hydrolyse auftretenden Verluste eher unter dem theoretischen Wert von 1,0.

4. G + C-Gehalt der DNS

Der G + C-Gehalt der DNS von 3 Organismen wurde an gereinigter DNS durch Bestimmung der Schmelzkurven ermittelt. Wie die Werte der Tabelle 3 zeigen, liegt der G + C-Gehalt bei *C. cartalyticum* wesentlich höher als der der beiden coryneformen Organismen.

Diskussion

Die Untersuchungen zeigen, daß *C. cartalyticum* den gleichen Peptidoglycantyp besitzt wie die drei anderen coryneformen Organismen, die aufgrund der numerisch taxonomischen Untersuchungen (Seiler et al., 1977) enge Beziehung zu dieser Art aufweisen, während sich der Peptidoglycantyp der übrigen *Cellulomonas*-Arten (Fiedler u. Kandler, 1973) sowohl durch den Gehalt an L-Ornithin an Stelle von L-Lysin als auch durch das Fehlen von D-Serin in der Interpeptidbrücke deutlich, wenn auch nicht drastisch davon unterscheidet. Man könnte darin eine Bestätigung für den durch die numerisch taxonomischen Untersuchungen nahegelegten Ausschluß von *C. cartalyticum* aus der Gattung *Cellulomonas* sehen. Das Auftreten des gleichen Peptidoglycantyps bei *C. cartalyticum* und den drei

anderen coryneformen Organismen ist jedoch nicht allzu schwer zu bewerten, da innerhalb der Gesamtgruppe der Coryneformen, zu denen auch die Gattung *Cellulomonas* zu rechnen ist, eine beachtliche Variation der Peptidoglycantypen auftritt und viele Fälle bekannt sind, in denen der gleiche Peptidoglycantyp in recht verschiedenen Verwandtschaftsbereichen auftritt (cf. Schleifer u. Kandler, 1972).

Wesentlich gewichtiger für die taxonomische Zuordnung ist der Befund, daß der G + C Gehalt von *C. cartalyticum* mit 76% erheblich über dem der beiden untersuchten coryneformen Organismen mit nur 54 bzw. 55% liegt und damit in den Bereich der bei den anderen *Cellulomonas*-Arten gefundenen Werte fällt (Stackebrandt u. Kandler, Veröffentlichung in Vorbereitung). Außerdem ergab auch die Überprüfung der cellulolytischen Eigenschaft, daß nur *C. cartalyticum* in der Lage war, Filtrierpapierschnitzel in einem glucosefreien Medium innerhalb von 2 Tagen völlig aufzulösen, während *C. manihot* und *B. liticum* selbst nach 14tägiger Bebrütung und gutem Wachstum keine Auflösung bewirkten.

Diese beiden Beobachtungen sprechen dafür, *C. cartalyticum* nicht mit den drei anderen coryneformen Organismen zu vereinigen, sondern bei *Cellulomonas* zu belassen. Der etwas abweichende Peptidoglycantyp und die relativ weit von *Cellulomonas* entfernte Einordnung in das Vernetzungsdiagramm, das fast nur auf Substratverwertungs-Merkmalen beruht (Seiler et al., 1977), können als Ausdruck der gegenüber den anderen *Cellulomonas*-Arten relativ isolierten Stellung innerhalb der Gattung angesehen werden. Dies kommt auch bei den Untersuchungen der DNS-Homologie (Stackebrandt u. Kandler, Veröffentlichung in Vorbereitung) deutlich zum Ausdruck, bei denen sich zwischen allen anderen Arten der Gattung *Cellulomonas* ein relativ hoher Homologiegrad von 35–50% ergab, während *C. cartalyticum* zu den anderen Arten nur einen Homologiegrad von rd. 20% aufwies.

Literatur

- Barksdale, L.: *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. Bacteriol. Rev. **34**, 378–422 (1970)
- Bergmeyer, H. U., Bernt, E.: Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., Bd. 1, S. 685–690. Weinheim: Verlag Chemie 1970
- Carta, G. R.: Production of single cell protein material. United States Patents 3.778.349 (1973)
- Cziharz, B.: Untersuchungen über die Zellwandzusammensetzung bei Stämmen der Gattung *Brevibacterium*. Diplomarbeit, Techn. Univ. München (1969)
- De Ley, J.: Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. **101**, 738–754 (1970)
- Fiedler, F., Kandler, O.: Die Mureintypen in der Gattung *Cellulomonas*. Bergey et al. Arch. Mikrobiol. **89**, 41–50 (1973)
- Fiedler, F., Schleifer, K. H., Cziharz, B., Interschick, E., Kandler, O.: Murein types in *Arthrobacter*, *Brevibacteria*, *Corynebacteria* and *Microbacteria*. Publ. Fac. Sci. Univ. J. E. Purkyne Brno **47**, 11–122 (1970)
- Koch, D., Schleifer, K. H., Kandler, O.: Die Aminosäuresequenz des Serin und Asparaginsäure enthaltenen Mureins von *Bifidobacterium bifidum* Orla-Jensen. Z. Naturforsch. **25B**, 1294–1301 (1970)
- Larson, D. M., Snetsinger, D. C., Waibel, P. E.: Procedure for determination of D-amino acids. Anal. Biochem. **39**, 395–401 (1971)
- Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. **3**, 208–218 (1961)
- Marmur, J., Doty, P.: Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol. **5**, 109–118 (1962)
- Schleifer, K. H., Kandler, O.: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev. **36**, 407–477 (1972)
- Seiler, H., Ohmayer, G., Busse, M.: Taxonomische Untersuchungen an gram positiven coryneformen Organismen unter Anwendung eines EDV-Programms zur Berechnung von Vernetzungsdiagrammen. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A **238**, 475–488 (1977)
- Stackebrandt, E., Kandler, O.: Biochemisch-taxonomische Untersuchungen an der Gattung *Cellulomonas*. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A **228**, 128–135 (1973)
- Veerkamp, J. H.: The structure of the cell wall peptidoglycan of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. Arch. Biochem. Biophys. **143**, 204–211 (1971)

Eingegangen am 27. Dezember 1977