

Über den fermentativen Abbau der Cellulose.¹⁾

Von

Hans Pringsheim.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. März 1912.)

Der rein hydrolytische Abbau der Cellulose durch Fermente ist bis auf den heutigen Tag ein ungelöstes Problem der physiologisch-chemischen Forschung gewesen.²⁾ Zwar findet sich in der Literatur bisweilen der Gebrauch der Bezeichnungen «Cellulase» oder «Cytase», hergeleitet von der Funktion des für diesen Abbau in Frage kommenden Fermentes. Seine Wirkungsweise und vor allem die Art der von ihm aus echter Cellulose gebildeten Stoffe sind noch völlig unbekannt. Was immer über den zytohydrolytischen Abbau bekannt gegeben wurde, bezog sich nicht auf die Spaltung der echten Cellulose, sondern auf die der Hemicellulosen,³⁾ die mit ihren Spaltungsfermenten vergemeinschaftet in vielen Pflanzen vorkommen. Denn diese Polysaccharide dienen als Reservematerial der Pflanzen und sie müssen durch Fermente in lösliche Form gebracht werden, wenn sie im Bedarfsfalle in den Stoffwechsel der Pflanzen gerissen werden sollen. Die echte Cellulose dient als Stützmaterial für die Pflanzen; sie wird deshalb von ihrem Stoffwechsel unberührt gelassen. Die pflanzenfressenden Tiere vermögen zwar Cellulose zu verdauen; sie sind in dieser Fähigkeit

¹⁾ Vorgetragen in der Sitzung der Deutschen Chemischen Gesellschaft am 26. Februar 1912.

²⁾ Vgl. hier: C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkung. Leipzig 1910. 3. Auflage, Spezieller Teil, Sechstes Kap., S. 110.

³⁾ Aus der umfangreichen Literatur vgl. vor allem: Reinitzer. Diese Zeitschrift, Bd. 23, S. 175 (1897); Newcombe, Annals of bot., Vol. 13, p. 49 (1899); Schellenberg, Flora, Bd. 98, S. 257 (1908).

aber von den ihren Verdauungstraktus bewohnenden Bakterien abhängig.¹⁾ So kommt die Fähigkeit, Cellulose zur Lösung zu bringen, nach den bisherigen Forschungsergebnissen ausschließlich den Mikroorganismen zu, die die Cellulose auf verschiedene Weise und unter verschiedenartiger Nebenwirkung auf ihren sonstigen Stoffwechsel, bei niederen und hohen Temperaturen, bei Zutritt und bei Abschluß von Luft, mit geringerer oder größerer Schnelligkeit abzubauen befähigt sind.

Alle bekannten Celluloseverzehrer unter den Mikroorganismen aber gehen in ihrer Wirkungsweise über den rein hydrolytischen Abbau der Cellulose hinaus. Sie bilden Stoffwechselprodukte, die den Weg des Abbaus der Cellulose in keiner Weise zu erkennen gestatten, Produkte, die auch bei anderen Gärungen beobachtet wurden, wie Methan, Wasserstoff, Kohlensäure, und neben geringen Mengen Milchsäure vornehmlich niedere Fettsäuren. Traubenzucker, das ausschließliche Produkt der energischen Säurehydrolyse der Cellulose, konnte im Stoffwechsel der Cellulose zersetzenden Mikroorganismen nie aufgefunden werden, und die Frage war ungelöst, ob dem energischen Prozeß der Cellulosegärung überhaupt eine Hydrolyse vorangehen muß, zumal wir wenigstens von Schimmelpilzen wissen, daß sie Disaccharide auch ohne den Besitz der respektiven hydrolytischen Fermente verbrennen können.²⁾ Eine einzige Bemerkung in der Literatur³⁾ läßt die Vermutung gerechtfertigt erscheinen, daß in einem nach dem Buchnerschen Verfahren aus dem Hausschwamm, *Merulius lacrymans*, hergestellten Preßsaft ein Cellulose spaltendes Ferment vorhanden war. Dieser Saft zeigte eine gewisse Einwirkung auf die Blätter von *Elodea*, denn er ließ bei mikroskopischer Beobachtung eine Korrosion der Tüpfel erkennen. Aber auch hier ist die Einwirkung auf echte Cellulose unbewiesen und über die Art der Spaltungsprodukte wird nichts ausgesagt.

¹⁾ Vgl. vor allem: Scheunert, Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 9 (1908), sonst Oppenheimer, l. c., S. 115.

²⁾ H. Pringsheim und G. Zemplén, Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 367 (1909).

³⁾ Kohnstamm, Beihefte zum bot. Zentralbl., Bd. 10, S. 90 (1901).

Theoretischer Teil.

Da nun die Zerlegung der Cellulose in der Natur auf die Mikroorganismen beschränkt zu sein scheint, so mußte nach dem hydrolytischen Ferment dieses Abbaus im Körper dieser Lebewesen geforscht werden. Der erste Gedanke war, es in einem nach dem Buchnerschen Verfahren aus ihnen dargestellten Preßsaft aufzufinden. Hierfür kamen die Cellulose energisch zersetzenden Bakterien nicht in Betracht, da sie von der Cellulose, auf der sie ausschließlich gedeihen und der sie fest anhaften, nicht zu trennen und wegen ihrer Kleinheit nur schwer zu zerreiben sind. Es wurde daher zuerst an die Darstellung eines Preßsaftes aus Cellulose zersetzenden Schimmelpilzen gedacht. Solche Pilze kann man nach dem Verfahren von G. van Itenson¹⁾ züchten und sie dann auf Würgegelatine in Reinkultur gewinnen. Einige der so gezüchteten nicht näher bestimmten Pilze, die aber nach ihrem Wachstums-Habitus zu den wahren Holzzerstörern gehörten, zersetzen Filtrierpapier ziemlich stark. Sie gedeihen aber auf der Cellulose nur langsam und sind von ihr, da sie das Papier durchwachsen, nicht zu trennen. Reichliche Pilzernten kann man auf Zuckerlösungen gewinnen; der aus ihnen dargestellte Preßsaft enthielt aber kein Cellulose spaltendes Ferment, was nicht verwunderlich ist, da Zucker als Spaltungsprodukte der Stärke auch die Amylaseproduktion hemmen.²⁾ Wurden aber auf Papier gewachsene Pilze durch kräftiges Schütteln mit Toluol abgetötet, so machte sich, worauf schon van Itenson hingewiesen hat, nach mehrtägiger Inkubation bei der dem Wachstum der Pilze angepaßten Temperatur eine vorher nicht bemerkbare Reduktion der Fehlingschen Lösung durch die ursprüngliche Nährflüssigkeit geltend. In dieser Nährlösung ließ sich dann Glukose als Phenylglukosazon nachweisen, wodurch der Beweis erbracht war, daß die Schimmelpilz-«Cellu-

¹⁾ G. van Itenson jr., Verslagen der Koninglijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam 1903, Deel XI, p. 807; Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 11, S. 689 (1904).

²⁾ Vgl. hierzu: Hans Pringsheim, Die Variabilität niederer Organismen, Berlin 1910, Kap. XIII, S. 76.

lase» aus dem Papier Glukose abspaltet. Dieses Resultat war für die auf Traubenzucker gut gedeihenden Pilze vorauszusehen. Ein Zwischenprodukt des Celluloseabbaus zu fassen, erschien aber bei den geringen Mengen des gebildeten Zuckers, die sich wegen des schlechten Wachstums der Pilze auf Papier nicht beliebig steigern ließen, wenig aussichtsvoll. Auch war durch den Ausfall des Versuches mit den Schimmelpilzen keineswegs der Beweis erbracht, daß die weit energischeren und für die Zersetzung der Cellulose im Boden weit wichtigeren Bakterien-Cellulosezersetzer den Abbau auf demselben Wege vollziehen würden. Denn sie können nach allen bisherigen Erfahrungen ausschließlich nur auf Cellulose und nicht auf Zuckerlösungen wachsen.

Um den Abbau dieser zu erforschen, waren folgende Gedankengänge ausschlaggebend. Unter kräftiger Gasabgabe vor sich gehende Gärungen können, wie man sich überzeugen kann, durch Antiseptika zum Stillstand gebracht werden. Diese Erscheinung kann auf zwei Weisen erklärt werden. Entweder sind die solche Gärungen veranlassenden Fermente selbst gegen die Einwirkung milder Antiseptika unbeständig, d. h. sie werden von ihnen zerstört oder die Fermente sind endoenzymatischer Natur. Im letzteren Falle würde zugleich mit dem Tod der Zelle eine Sistierung der osmotischen Zirkulation eintreten, welche die Berührung der Fermente mit ihren spezifischen Umsatzstoffen verhindern würde. Welcher der beider genannten Gründe für die Aufhebung einer Gärung durch ein Antiseptikum entscheidend ist, dürfte im einzelnen Falle schwer zu entscheiden sein. Mit Sicherheit läßt sich der Beweis überhaupt nur dann erbringen, wenn es nach Aufspaltung der Zelle gelingt, in ihrem Saft positive Fermentwirkung nachzuweisen. Denn der negative Befund ist noch kein Beweis dafür, daß das Ferment nicht in der Zelle vorhanden war.¹⁾ — Andererseits aber sind bekanntlich die hydrolytischen Fermente auch bei Anwesenheit antiseptischer Stoffe wirksam, wie aus der

¹⁾ Vgl. hierzu: H. Pringsheim und G. Zemplén, Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 367 (1909); E. Abderhalden und H. Pringsheim, *Ibid.*, Bd. 65, S. 180 (1910).

großen Zahl der in Gegenwart von Toluol, Chloroform usw. ausgeführten Hydrolyseversuche hervorgeht. Kombiniert man diese beiden Erfahrungen, so kommt man zu einer Möglichkeit, den hydrolytischen Abbau von dem der Vergärung der Abbau-
produkte zu trennen; gewissermaßen eine Fraktionierung der gemischten Fermente eines Organismus vorzunehmen, bei der die Hydrolyse erhalten bleibt und die Gärungstermentwirkung aufgehoben wird!

Auf Grund dieser Spekulation wurde versucht, den hydrolytischen Abbau der Cellulose vergärenden Bakterien von ihrem Gärvermögen zu trennen. Bei einer normalen Cellulosegärung lassen sich rein hydrolytische Spaltungsprodukte des Polysaccharids nie nachweisen; die Gärung geht immer weiter und sie führt zu Stoffwechselendprodukten, welche für die in den Kreis meiner bisherigen Untersuchung gezogene Vergärung der Cellulose durch verschiedene Arten ihrer bakteriellen Vergärer wie folgt befunden wurden: 1. Methangärung der Cellulose: Methan, Kohlensäure und niedere Fettsäuren bis zur Buttersäure. 2. Wasserstoffgärung der Cellulose: Wasserstoff, Kohlensäure und niedere Fettsäuren bis zur Buttersäure. 3. Thermophile Cellulosegärer: Methan, Wasserstoff, Kohlensäure, Ameisensäure und Essigsäure. 4. Denitrifizierende Cellulosebakterien: Stickstoff und Kohlensäure.¹⁾ Will man in einer der vier hier genannten Gärungen das hydrolytische Ferment der Cellulose zur ausschließlichen Wirkung bringen, so muß man zuerst die zu untersuchende Gärung einleiten, wie das im experimentellen Teil beschrieben werden wird, dann muß man abwarten, bis sie sich auf die größtmögliche Höhe der Wirksamkeit erhoben hat, was man an der Energie der Gasabgabe beurteilen kann, und darauf muß die Gärung durch den Zusatz eines geeigneten Antiseptikums ruckweise zum Stillstande gebracht werden. Das plötzliche und nicht allmähliche Anhalten der Gärung ist Bedingung für die Ansammlung der

¹⁾ Genaueres über diese Gärungen findet sich in meinem vor dem Sonderausschuß für Bodenbakteriologie der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft am 19. Februar 1912 gehaltenen Vortrag. Mitteilungen der D. L. G., 1912.

hydrolytischen Spaltungsprodukte, die sich als Zucker erweisen. Bei langsamer Unterbrechung des Gärvorgangs oder bei Wiedereintritt einer auch nur schwachen Gärung können keine Zwischenprodukte nachgewiesen werden, da sie dann zuerst und ehe sie durch neue Spaltungsprodukte der Cellulose ersetzt sind, dem Gärungsferment verfallen und so aus der Nährflüssigkeit der Cellulosebakterien verschwinden.

Die Ansammlung der Spaltungsprodukte gibt sich durch eine schwache Reduktion der Gärflüssigkeit gegen Fehlingsche Lösung kund. Man prüft am besten nach Zusatz von etwas Sodalösung, um den als fettsaures Salz gelösten Kalk auszufällen. Wie nun der Zerfall der Cellulose durch die bei niederen Temperaturen bis zur Bruttemperatur von 37° wirkenden Bakterien ein langsamer ist, der Art, daß zur völligen Lösung weniger Gramm Cellulose in ein paar Litern Nährflüssigkeit mehrere Monate nötig sind, so ist auch die hydrolytische Spaltung ein nur langsam eintretender Vorgang, der nie zu einer reichlichen Sammlung von Hydrolyseprodukten führen kann. Denn die Wirkung der hydrolytischen Fermente bleibt, wie die aller andern in Lösungen befindlichen Fermente, nur eine beschränkte Zeit lang bestehen. Dann werden sie durch Zerfall, meist wohl unter dem Einfluß einer Proteolyse, unwirksam. Man muß also mit großen Flüssigkeitsmengen arbeiten und sie zur Isolierung der gebildeten Zucker bei einer diese nicht verändernden Temperatur im Vakuum eindampfen, wenn man zu einer für ihre Identifizierung genügenden Menge von Charakterisierungsprodukten gelangen will. Bei der Methan-, der Wasserstoff- und der denitrifizierenden Gärung der Cellulose tritt also eine erst sich durch Reduktion kundgebende Anhäufung von Zuckern erst in ein paar Tagen bis zu einer Woche ein. Der Gedanke war hierbei in Erwägung zu ziehen, ob nicht höhermolekulare Celluloseabbauprodukte nicht reduzierender Natur in der Zwischenzeit gebildet würden? Hier war die Voraussetzung zu machen, daß solche durch Säurehydrolyse in reduzierende Zucker gespalten werden würden. Der Versuch lehrte, daß das nicht der Fall war, und daß der hydrolytische Abbau, wie wir sehen werden, direkt zur Cellobiose

führt, ebenso wie die Stärke durch fermentative Hydrolyse als erstes einheitliches Produkt das Disaccharid, die Maltose, gibt.

Weit energischer als die besprochenen Gärungen wirkt die durch thermophile Bakterien auf die Cellulose. Was sich durch erstere in Monaten erreichen läßt, die Lösung von ein paar Gramm Cellulose, kann durch die thermophilen Bakterien in ebenso viel Tagen erreicht werden. Dem entspricht auch eine weit schnellere Anhäufung der Spaltungsprodukte unter dem Einfluß antiseptischer Stoffe. Schon nach 24 Stunden macht sich hier eine verhältnismäßig stärkere Reduktion gegen Fehlingsche Lösung bemerkbar, und schon nach wenigen Tagen ist die Cellobiose völlig in Glukose gespalten. Denn unter normalen Temperaturverhältnissen ging der Abbau über das Disaccharid hinaus bis zum Monosaccharid, wofür offenbar das gleichzeitige Vorhandensein der «Cellobiase» in den Cellulosevergärrern verantwortlich war, eines Fermentes, das im Emulsin und in verschiedenen Schimmelpilzen aufgefunden wurde.¹⁾

Der Einfluß der Temperatur auf den Celluloseabbau.

Das Temperaturoptimum der Cellobiase, das bei 46° gefunden wurde,²⁾ liegt genau in der Mitte zwischen den Temperaturbedürfnissen der Thermophilen-Cellulosezersetzer, welche bei 55° kultiviert wurden, und den der andern Cellulosebakterien, die bei 37° zum Wachstum gelangten. Da nun bei den gewöhnlichen Methan- und Wasserstoffvergärrern wie auch bei den Denitrifizierern in Analogie mit dem verspäteten Auftreten der ersten Spaltungsprodukte im Gegensatz zu den Thermophilen auch eine weit längere Zeit von mehreren Wochen verstreichen mußte, bis die Cellobiose komplett in Glukose gespalten war, so muß dieses Ergebnis nicht so sehr dem Einfluß

¹⁾ Skraup und König, Monatshefte f. Chemie, Bd. 22, S. 1011 (1901); E. Fischer und Zemplén, Annalen der Chemie, Bd. 365, S. 1 (1909); Bd. 372, S. 254 (1910); H. Pringsheim und Zemplén, l. c.: G. Bertrand und Holderer, Bull. de la Soc. chim. de France, Série 4. t. 7, p. 177 (1910).

²⁾ G. Bertrand und Compton, Bull. de la Soc. chim. de France, Série 4. t. 9, p. 100 (1911).

der Temperatur wie der Menge oder Aktivität des vorhandenen Fermentes zugeschrieben werden.

Es wurde dann die Frage zur Entscheidung gebracht, innerhalb welcher Temperaturgrenzen die Cellulase überhaupt zu wirken vermag. Hierfür kam das Ferment der energischen Thermophilen-Zersetzer zur Verwendung. Sie wurden wiederum bei 55° gezüchtet. Im Stadium starker Gasabgabe wurde die Gärung nun durch Zusatz der passenden antiseptischen Substanz unterbrochen und nun nicht wie früher bei der für das Wachstum der Bakterien nötigen Temperatur von 55°, sondern bei andern Temperaturverhältnissen aufbewahrt. Das Resultat dieser Versuche war recht bemerkenswert. Es zeigte sich nämlich, daß die Cellulase innerhalb eines sehr weiten Temperaturgebietes wirksam ist. Sie zersetzt die Cellulose bei den zwischen 20 und 70° liegenden Temperaturen, also innerhalb eines Temperaturgebietes von 50°, so daß sie bezüglich ihrer Anpruchslosigkeit in dieser Richtung die meisten Fermente übertreffen dürfte. Bei 10° war ebenso wie über 70° kein Angriff des Fermentes auf die Cellulose mehr zu beobachten. Sehr klar geht aus diesen Befunden hervor, daß die Fermentwirkung und das Leben der Cellulosebakterien getrennte Erscheinungen sind. So weit bekannt, wird die Vergärung nur innerhalb der Temperaturgrenzen der Lebensfunktion vollzogen. Sie steht also im scharfen Gegensatz zur Hydrolyse der Cellulose. Dies ließ sich durch einen einfachen Versuch verdeutlichen. Entnimmt man eine stark gärende thermophile Cellulosekultur dem auf 55° eingestellten Thermostaten, so hört die Gärung sofort auf. Da nun das hydrolytische Ferment auch bei 20° noch seine Wirkungsweise entfaltet, so mußte es möglich sein, durch bloße Temperaturdifferenz zu den intermediären Abbauprodukten der Cellulosegärung zu gelangen. Dies war in der Tat der Fall. Schon nach 24 Stunden reduzierte die bei 20° aufbewahrte Gärflüssigkeit, in der während dieser Zeit also die Gärung sistiert war, die Fehlingsche Lösung, und in diesem, wie in allen andern Fällen, die hier angeführt werden, konnte der abgespaltene Zucker durch sein Osazon nachgewiesen werden. Hier war also eine Fraktionierung der Fermente durch bloße Temperatureinwirkung gelungen.

Die Hoffnung, so weit entfernt vom Temperaturoptimum der Cellulase, also 35° unter diesem, die Wirkung dieses Fermentes aufzuheben und den Abbau bei der Cellobiose anzuhalten, wurde nicht verwirklicht. Auch bei 20° ging die Hydrolyse der Cellulose teilweise über die Cellobiose hinaus und als Hauptprodukt wurde Glukose gefaßt. Aber auch das Problem der doppelten Fraktionierung der drei Fermente der Cellulosebakterien derart, daß das Gärungsferment und die Spaltung der Cellobiose ausgeschaltet und nur die Cellulaseaktivität bestehen gelassen wurde, ist schließlich gelöst worden. Bei 67° nämlich, also nahe am Tötungspunkt der Cellulase, wurde bei gleichzeitiger Unterdrückung des Gärfermentes durch das Antiseptikum auch die Cellobiase außer Tätigkeit gesetzt. Bei dieser Temperatur gelang es, den Celluloseabbau so zu leiten, daß als einziges Hydrolyseprodukt Cellobiose erhalten wurde.

Es fragt sich, ob man aus diesem Befund den Schluß ziehen darf, daß das Gesamtmolekül der Cellulose aus Cellobiosekomplexen zusammengesetzt ist? In der Beantwortung dieser Frage muß man sehr vorsichtig sein. Von vornherein war nicht ohne weiteres die Möglichkeit zu verneinen, daß durch das cytolytische Ferment nur ein Teil des großen Moleküls der Cellulose angegriffen werden könne und ein zuerst unangegriffener Rest dann in anderen Spaltungsprodukten zu lösen sei. Um dieser Möglichkeit zu begegnen, wurde das nach der fermentativen Zersetzung restierende Filtrierpapier, welches in der Hauptzahl der Versuche als Cellulosematerial angewandt wurde, nach entsprechender Reinigung immer zu neuen Abbauversuchen verwandt. Immer aber wurden dieselben Spaltungsprodukte erhalten. Auch konnte ich mich überzeugen, daß durch die hier genannten und noch andere Arten Cellulose zersetzender Mikroorganismen¹⁾ eine restlose Lösung des Polysaccharids erreicht werden kann. Hier sei auch erwähnt, daß beim Abbau der Watte²⁾ eine in derselben Richtung wie bei dem des Papiers verlaufende Hydrolyse vor sich geht. Die Kombination dieser Tatsachen erleichtert es, den Gedanken zu fassen, daß das Gesamtmolekül der Cellulose sich aus

¹⁾ Vgl. den l. c. genannten Vortrag.

Cellobiosekomplexen zusammensetzt. Weiter sollte man in den Schlußfolgerungen aus den hier angeführten Tatsachen nicht gehen.

Eins steht jedenfalls schon jetzt fest, daß einer Vergärung der Cellulose eine Hydrolyse in Cellobiose und Glukose vorausgeht, gleichgültig welches die Endprodukte des Stoffwechsels der verschiedenen Cellulosezerseher sein mögen. Das hydrolytische Ferment der hier untersuchten vier Arten von Cellulosevergärrern ist stets das gleiche und es verdient — mit Ausschluß aller andern Fermente, denen der ihm zukommende Name bisweilen gegeben wurde, z. B. den Spaltungsfermenten der Hemicellulosen — allein den Namen «Cellulase».

Die Extrahierbarkeit des Fermentes.

Die Cellulose kann wegen ihrer Unlöslichkeit in der Nährlösung natürlich nicht in die Zellen ihrer Vergärrer hineindiffundieren. Man müßte demnach annehmen, daß das Cellulose spaltende Ferment von der Zelle abgesondert wird, wenn es auf sein Substrat wirken soll. Damit ist aber noch nicht entschieden, ob das Ferment in wasserlöslicher Form in die Nährlösung gelangt und hier auf die Cellulose wirkt oder ob es von den Zersetzern der Cellulose nur auf Grund eines Reizes ausgeschieden wird, welcher von dem Polysaccharid auf seine Verzehrter ausgeübt wird. Für letztere Annahme spricht zuerst die Tatsache, daß die Cellulose angreifenden Mikroorganismen, seien es nun Schimmelpilze oder Bakterien, alle ohne bisher bekannt gewordene Ausnahme, nur in direkter Berührung mit ihrem Kohlenstoffnährmaterial gedeihen. Dies geht so weit, daß die Cellulosezerseher das Papier oder die Watte gewissermaßen durchwachsen, sodaß am Ende des Zersetzungsprozesses an Stelle der Cellulose ein gleichgeformter, zusammenhängender Schleim von Cellulosezersehern übrig bleibt, der erst durch Schütteln in seine Bestandteile zerfällt. Eine Fernwirkung der Zersetzer auf die Cellulose ist demnach nicht anzunehmen, und es wäre auch schwer ersichtlich, wie diese nur auf Cellulose gedeihenden Organismen auf die Anwesenheit ihrer elektiven Nahrungsquelle ohne direkte Be-

rührung reagieren sollten. Trotzdem also kein Eintritt der Cellulose in die Zelle möglich ist, welches doch im allgemeinen die Forderung für die Wirkungsmöglichkeit eines Endoenzyms sein muß, braucht noch keine Wasserlöslichkeit der Cellulase vorausgesetzt zu werden. Das Experiment hat auf diese Frage jedenfalls die Antwort gegeben, daß in einem bakterienfreien Pukalfiltrat einer energischen thermophilen Cellulosegärungskultur kein hydrolysierendes Ferment vorhanden war, welches auf frische von Bakterien freie Cellulose spaltend zu wirken imstande gewesen wäre. Ich bin deshalb der Meinung, daß die Cellulase ein Endoenzym ist, das nur auf Grund des Reizes, den die Cellulose auf die Zelle ausübt, abgeschieden wird.

Die Wirksamkeit verschiedener Antiseptica.

Bei der Auswahl der Antiseptica waren nur solche zu berücksichtigen, die mit Wasserdampf flüchtig sind, da sie nur auf diese Weise bequem aus den Lösungen zu entfernen sind, ehe der Nachweis der Spaltungsprodukte in Angriff genommen wird. Ferner war solchen der Vorzug zu geben, die keine Reduktion der Fehlingschen Lösung bewirken, weil nur auf Grund dieser Reaktion eine Anhäufung der Spaltungsprodukte zu verfolgen war. Deshalb gebührte dem Toluol der Vorzug vor dem Chloroform, welches letzteres geringfügige Reduktionserscheinungen zeigt. Zwar konnte dieser Mangel durch Verdampfen vor Zusatz der Fehlingschen Lösung beseitigt werden, aber das Chloroform wirkte in keiner Weise energischer als das Toluol. Dieses reichte, wenn fünf Minuten lang mit den Gärungen geschüttelt und dann mit ihnen in gut verschlossenen Flaschen in Berührung gelassen wurde, bei den bei Bruttemperatur (37°) verlaufenden Gärungen in den meisten Fällen aus. Doch waren Mißerfolge nicht auszuschalten, derart, daß die Gärungen unter dem Toluol im Verlaufe eines Tages wieder schwach in Gang kamen. Durch längeres Schütteln, auch während zweier Stunden an einer sehr energischen rotierenden und gleichzeitig schüttelnden Maschine wurde daran nichts geändert.

Durchaus unzureichend erwiesen sich Toluol und Chloro-

form bei der hohen Temperatur der energischen, thermophilen Cellulosegärung. Durch diese Antiseptika wurde sie nie angehalten, sie ging vielmehr in Berührung mit ihnen in unge-trübter Stärke weiter. Bisweilen ließ sich die gewünschte Sistierung durch Sättigung der Gärflüssigkeit mit Thymol erreichen. Doch war auch dieses Bakteriengift von unzuver-lässiger Wirksamkeit. Noch weniger geeignet waren Guajakol und o-Kresol; auch wurde an dieser Tatsache nichts geändert, wenn die Löslichkeit der drei zuletzt genannten Stoffe durch einen Zusatz von 5% Äthyl- oder Methylalkohol verstärkt wurde. Auch hier half das lange Schütteln gar nichts. Ebenso-wenig hatte Amylalkohol die Fähigkeit, die Gärung anzuhalten. Aber nicht einmal die geringe Löslichkeit der genannten Sub-stanzen war entscheidend für ihr mangelndes Sterilisations-vermögen. Denn selbst in 5%iger Lösung von Pyridin oder 1%iger Lösung von Phenol bestand die Gärung in fast un-geschwächtem Maße fort. Mit der Konzentration weiter herauf-zugehen, schien zwecklos, da durch sie das hydrolytische Ferment sicher vernichtet worden wäre. Es muß aber bemerkt werden, daß in keinem Falle, in dem die Aufhebung der Gärung in der gewünschten plötzlichen Art gelang, Anhäufung der Hydrolyseprodukte ausgeblieben ist. Die Cellulase ist also gegen Antiseptika recht beständig. Wenn man durch die Gär-flüssigkeit zwei Stunden lang mit Äther oder Chloroform be-ladene Luft saugt, so halten die Gärungen anfangs an. Aber selbst der Zusatz von Toluol kann nicht verhindern, daß sie nach Verlauf eines Tages wieder energisch im Gang sind. Ich führe diese zeitraubenden Versuche hier an, weil sie zeigen, welche außerordentliche Resistenzkraft in der Natur wirksame Prozesse gegen so energische Gifte wie die angeführten zeigen können. Derartige Erscheinungen sind, soviel ich weiß, bisher nie beobachtet worden. Es kann sich bei ihnen auch nicht um eine Gärwirkung der Fermente der Cellulosezersetzer nach ihrem Tode handeln, denn dann hätten die Gärungen kurze Zeit nach der Behandlung mit den antiseptischen Stoffen an-halten müssen. Das war nicht der Fall, sie bestanden dauernd fort und waren selbst nach mehreren Tagen noch im Gange.

Als geeignetes Mittel, um die thermophile Cellulosezer-
setzung zum Anhalten zu bringen und ihre Spaltungsprodukte
anzuhäufen, erwies sich schließlich das Jodoform. Man ver-
wendet es so, daß man für 2 l Gärflüssigkeit etwa 1 g in
50 ccm Aceton löst und diese Lösung dann in die gärende
Cellulosekultur unter Schütteln eingießt. Dadurch wird das
wieder ausfallende Jodoform in feiner Verteilung mit der Kultur
in Berührung gebracht. In 24 bis 48 Stunden kann man dann
die Spaltungsprodukte nachweisen.¹⁾

Der chemische Nachweis der Spaltungsprodukte.

In der durch Eindampfen unter vermindertem Druck auf
geringes Volumen gebrachten Hydrolyseflüssigkeit, die man,
wie im experimentellen Teil angegeben, möglichst von Verun-
reinigungen durch Salze befreit hat, kann man die Glukose
mit verhältnismäßiger Leichtigkeit in Gestalt ihres schwer lös-
lichen Phenylglukosazons nachweisen, das durch den Zer-
setzungspunkt charakterisierbar und durch den Stickstoffgehalt
als Osazon einer Monose identifizierbar ist. Auch zeigt es in
einem Pyridin-Alkohol-Gemisch die von Neuberg²⁾ angegebene
Drehung.

Weit schwieriger und unsicherer ist der Nachweis des
Disaccharids. Daß es sich um ein solches handelte, war aus
dem Stickstoffgehalt seines in Wasser löslichen und auf diese
Weise von Glukosazon zu trennenden Osazons zu erkennen.
Der Zersetzungspunkt erreichte nach der im experimentellen
Teil geschilderten Reinigung am selben Thermometer mit aus
reiner Cellobiose dargestelltem Osazon den von Skraup und

¹⁾ Nachträglich bin ich darauf aufmerksam gemacht worden, daß
Vandevelde (Biochemische Zeitschrift, Bd. 3, S. 318, 1907) eine Lösung
von Jodoform in Aceton als geeignetes Mittel empfohlen hat, um bei
biologischen Versuchen Mikroorganismenentwicklung auszuschalten. Es
besteht also eine naturgemäße Beziehung zwischen der von Vande-
velde aufgefundenen Entwicklungshemmung und der von mir ausgeführten
Abtötung von Mikroorganismen durch das in der genannten Weise ver-
wandte Antiseptikum.

²⁾ Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. 32, S. 3384 (1899).

und König angegebenen Wert von 198° . Auch der Mischschmelzpunkt mit dem reinen Cellobiosazon war derselbe, während die Verunreinigung mit den Osazonen anderer Disaccharide, wie ich mich überzeugt habe, eine merkliche Depression des Schmelzpunkts zur Folge hatte. Ferner konnte für die Drehung im Pyridinalkohol Gemisch der durch reines Cellobiosazon erhaltene Wert abgelesen werden. Vor allem aber zeigte der Zucker selbst zwei der Cellobiose zukommende Eigenschaften. Er wurde von gewöhnlicher Hefe nicht vergoren, unterschied sich dadurch von der Maltose und gehört somit der Klasse der α -Glukoside nicht an. Dagegen wurde er durch seine Hydrolyse mit Emulsin ebenso wie die Cellobiose als zu den β -Glukosiden gehörig befunden.

Keins der beigebrachten Daten würde für sich allein genügen, um das Disaccharid als Cellobiose zu charakterisieren. Die Zersetzungspunkte der Osazone verschiedener Disaccharide liegen zu nahe beieinander und sind von der Schnelligkeit des Erhitzens zu sehr abhängig, als daß man ihnen zu große Beweiskraft zuerteilen könnte. Die Drehung der Cellobiose im Pyridin-Alkohol-Gemisch, die in zweiprozentiger Lösung im 1 dm-Rohr zu $-0,36^{\circ}$ gefunden wurde, ist zu gering, um eine scharfe Charakterisierung zu ermöglichen. Und die Nichtspaltbarkeit durch Maltase bei gleichzeitiger Spaltbarkeit durch Emulsin könnte natürlich noch anderen bekannten (Isomaltose und Gentiobiose), oder unbekanntem Glukose- β -glukosiden zukommen. Die Kombination der beigebrachten Daten aber, in Verbindung mit der Tatsache, daß in Analogie zum chemischen Abbau der Cellulose Cellobiose zu erwarten war, scheint mir als Beweis für das Auftreten dieses Disaccharids bei der fermentativen Hydrolyse der Cellulose zu genügen.

Schlußfolgerungen.

Der Vorzug der von mir gewählten Methode, um die Zwischenprodukte des Celluloseabbaues zu fassen, besteht in der sicher erlaubten Annahme, daß die Hydrolyse des Polysaccharids durch die milde Wirkung der Antiseptika nicht aus ihrer natürlichen Richtung herausgedrängt worden ist. Diese

Voraussetzung war bei der unter starker Temperaturerhöhung vor sich gehenden Esterifizierung der Cellulose mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure nicht ohne weiteres zu machen. Deshalb kann man erst jetzt die Cellobiose als natürliches Abbauprodukt der Cellulose ansehen, und ihr im Celluloseabbau die Stelle anweisen, welche die Maltose im Abbau der Stärke verdient.

Ferner dürfte sich meine Methode der Fraktionierung verschiedener Fermente durch Antiseptika und durch den Temperatureinfluß noch dazu eignen, in anderen Fällen biologischer Zersetzungen hydrolytische und vielleicht auch andere intermediäre Spaltungsprodukte zu fassen.

Vor ein paar Jahren habe ich gezeigt, daß die Cellulose als Energiematerial für die Assimilation des Luftstickstoffs durch Bakterien dienen kann, wenn man sie in Abwesenheit einer Stickstoffquelle durch die kombinierte Wirkung celluloselösender und stickstoffbindender Bakterien zersetzt.¹⁾ Da die Cellulose selbst dem Angriff der Stickstoffbinder widersteht, und die Endprodukte der Cellulosezerersetzer als Energiequelle für die Stickstoffsammler nicht in Frage kommen, so konnten hierfür nur die Zwischenprodukte des Celluloseabbaus ausgenützt werden. Daß gerade die Glukose als Gärmaterial für die stickstoffbindenden Bakterien vorzüglich geeignet ist, haben zahlreiche Versuche gelehrt. Deshalb wird es dieser beim Abbau der Cellulose entstehende Zucker sein, den die Stickstoffsammler zu ihrer Funktion ausnutzen, sobald er ihnen durch die hydrolytischen Fermente der Cellulosebakterien zur Verfügung gestellt wird.²⁾ Die Cellulose kann aber, wie wir gesehen haben, auch als Energiematerial für die Freimachung des gebundenen Stickstoffs aus Salpeter dienen, und auch hier wird ihr Abbauprodukt, die Glukose, als das Energie liefernde Gärmaterial zur Verwertung kommen. Welcher dieser beiden für den Haushalt der Natur so wichtigen Prozesse eintritt, hängt also nicht von der Art der Energie liefernden Zwischenprodukte,

¹⁾ H. Pringsheim, Zentralbl. f. Bakteriologie, II. Abt., Bd. 23, S. 300 (1909); Bd. 26, S. 221 (1910).

²⁾ H. Pringsheim, Biologisches Zentralbl., Bd. 31, S. 65 (1911).

die in beiden Fällen ja die gleichen sind, sondern von der Klasse der im Erdboden in Funktion tretenden Mikroorganismenflora ab. Auf die möglichen praktischen Schlußfolgerungen dieser Ergebnisse bin ich an anderer Stelle eingegangen.¹⁾

Die Herbivoren beziehen einen nicht unbeträchtlichen Teil der Kohlehydrate der Nahrung in Form von Cellulose. Auch die Omnivoren vermögen sie auszunützen. Die warmblütigen Tiere selbst besitzen aber kein Cellulosespaltungsvermögen. Die Cellulose spaltende Kraft ihres Verdauungstraktus ist auf Bakterien zurückzuführen.²⁾ Dabei bleibt die Frage noch unbeantwortet, wie die Ausnutzung der Cellulose bei der Verdauung auf dem Umwege über die Bakterien gelingt. Denn die Endprodukte ihres bakteriellen Abbaus sind zu energiearm, als daß sie die Kohlehydrate in so beträchtlicher Weise ersetzen könnten. Die eiweiß- und fettsparende Wirkung war bei 100 g Cellulose in einigen Experimenten mit 75 g Rohrzucker gleichwertig.³⁾ Auch die Theorie, daß die Cellulose lösliche Kohlenhydrate vor dem Angriff durch die Mikroorganismenflora des Magendarmkanals schützt, kann nicht zu Recht bestehen. Denn die Cellulose wird ja ausschließlich durch ihre spezifischen Vergärer und nicht von anderen Mikroorganismen angegriffen; daher kann sie auch lösliche Kohlehydrate nicht vor der Zersetzung durch andere als Cellulosebakterien schützen.

Die Erklärung der Ausnutzung der Cellulose als Kohlehydrat bei der Verdauung der Herbi- und Omnivoren, welche der biologischen Forschung solche Rätsel aufgegeben hat, ist vielmehr auf einfache Weise durch die Auffindung der löslichen Kohlehydrate als Zwischenprodukte des bakteriellen Celluloseabbaus gegeben. Die hydrolytischen Fermente der den Magendarmtraktus bewohnenden Cellulosebakterien stellen dem Organismus der Tiere, die sie bewohnen, Cellobiose und

¹⁾ H. Pringsheim, Mitteilungen der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft., 1912; vgl. auch Alf. Koch, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 27, S. 1 (1910).

²⁾ Vgl. z. B. Scheunert, Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 9 (1906).

³⁾ Vgl. die Literaturzusammenstellung bei Zemplén. Abderhalden, Biochem. Handlexikon, Bd. 2, S. 210 (1911).

weiterhin Glukose zur Verfügung. Diese Zucker werden zum großen Teile fortgeführt und zum Ansatz ausgenutzt, ehe sie durch das Gärungsferment der Cellulosebakterien weiter zersetzt werden können. Der Prozeß verläuft in völliger Analogie zu der Ausnutzung der intermediären Spaltungsprodukte der Cellulose durch die Stickstoff bindenden Bakterien, bei dem er sich durch die Stickstoffsammlung quantitativ verfolgen ließ. Daß hierbei ein Teil der Abbauprodukte der Cellulose verloren geht, weil er der Vergärung durch die Cellulosebakterien selbst verfallen muß, ist nur natürlich. Dadurch erklärt sich die Tatsache, daß die Cellulose den löslichen Kohlehydraten nicht gleichwertig gut ausgenützt wird, daraus resultiert auch der Befund des Methans als Darmgas.

Experimenteller Teil.

A. Der Celluloseabbau durch denitrifizierende Bakterien.

Nach dem Vorschlag von van Itenson leitet man eine denitrifizierende Cellulosezersetzung ein, indem man 2% Filtrierpapier in Leitungswasser unter Zusatz von 0,25% KNO_3 und 0,05% K_2HPO_4 aufschwemmt, eine Stöpselflasche mit der Nährlösung vollfüllt und mit Grabenmoder beimpft. Verwandt wurde ein Schlamm aus der Tiefe der Bäche im hiesigen Tiergarten. Inkubiert man bei 37° , so setzt im Laufe einer Woche energische Stickstoffentbindung ein, durch die das Papier in die Höhe getrieben wird. Man setzt das Antiseptikum nun nicht sogleich zu, sondern gießt von der Nährlösung, die nun durch das aus dem Salpeter gebildete Kaliumcarbonat deutlich alkalisch ist, ab. Dann fügt man zu dem Papier neue Nährflüssigkeit, in der man eventuell das KNO_3 durch $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ ersetzt. Durch die mehrfache Behandlung mit den denitrifizierenden Bakterien wird die Gärung verstärkt und das Papier gewissermaßen angeätzt, woraufhin die Spaltung in Hydrolyseprodukte bei Sistierung der Gärung durch das Antiseptikum gefördert wird. Der Ersatz des KNO_3 durch das $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ hat den Zweck, die alkalische Reaktion, welche den Zuckern beim Eindampfen gefährlich werden

könnte, zu vermeiden und die schnelle Spaltung der Cellobiose in Glukose zu verzögern. Denn der Baryt wirkt auf diesen Prozeß hemmend ein. Wie schon gesagt, kann man nach dem Waschen die nichtzersetzte Cellulose immer zu neuen Abbauversuchen verwenden; dann läßt sich die Vergärung mit KNO_3 ganz vermeiden und man vergärt nur einmal bis zur starken Stickstoffentbindung mit $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$. So vorbereitetes Papier wird als «alte Cellulose» bezeichnet werden.

Nachweis der Glukose.

Um einen hinderlichen Salzgehalt der stark zu konzentrierenden Nährflüssigkeit zu vermeiden, kann man die Vorschrift van Itensons dahin modifizieren, daß man den Prozentgehalt von KNO_3 oder $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ auf 0,05% und den von K_2HPO_4 auf 0,01% reduziert. Diese Konzentrationen kamen immer in Anwendung.

15 g alter Cellulose in $\frac{1}{2}$ l Nährflüssigkeit mit 0,05% KNO_3 wurde im Zustande starker Gasabgabe am 9. Febr. 1912 fünf Minuten lang mit Toluol geschüttelt, woraufhin die Gärung sistiert wurde. Nach 10 Tage langem Stehen bei 37° wurde vom unzersetzten Papier abfiltriert, im Vakuum bei $60\text{--}70^\circ$ auf kleines Volumen eingedampft, in der Kälte mit Alkohol gefällt und nach dem Absaugen der ausgefallenen Salze bei vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Der in etwa 15 ccm Wasser aufgenommene Rückstand wurde jetzt mit wenig Harnstoff versetzt und nach schwachem Ansäuern mit Essigsäure im Wasserbade erwärmt. Dadurch werden eventuell als Zwischenprodukt der Nitratreaktion noch vorhandene Nitrite, die dem Phenylhydrazin gefährlich werden könnten, zerstört. Dann erhitzte man nach Zugabe von 1 g Natriumacetat und 0,5 g schneeweißem, aus Alkohol umkrystallisiertem Phenylhydrazinchlorhydrat $1\frac{1}{2}$ Stunden im kochenden Wasser. Das sich bildende Osazongemisch wurde kalt abfiltriert und das Glukosazon durch Auskochen mit Wasser vom Cellobiosazon getrennt. Nachdem ersteres noch mit Chloroform gewaschen war, wurde es aus 50%igem Alkohol umkrystallisiert. Seine Menge betrug dann 0,04 g und sein Schmelzpunkt lag bei 205° .

0,009463 g Substanz gaben bei der mikroanalytischen Stickstoffbestimmung nach Pregl (vgl. Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. V, Teil II, S. 1307 (1912) 1,242 ccm N bei 18° und 749 mm.

Theorie 15,6% N gef. 15,2% N.

Nachweis der Cellobiose.

6 Liter einer Aufschwemmung von 3% alter Cellulose mit 0,05% $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ wurden am 30. X. 10. mit einer Denitrifikationskultur beimpft, am 2. XI. mit Toluol versetzt, worauf am 7. XI. Reduktion durch Fehlingsche Lösung nachweisbar war. Daraufhin wurde die von Papier abfiltrierte Lösung unter vermindertem Druck bei 60—70° bis auf 200 ccm abgedampft. Dann wurde das Baryum, welches die Hefegärung schädigt, mit Natriumsulfatlösung gefällt, das Filtrat weiter auf 100 ccm eingedampft und mit absolutem Alkohol gefällt, bis im Filtrat der Fällung nur noch geringe Salzmengen durch Alkohol niederschlagen waren. Der Alkohol wurde hierauf im Vakuum zur Trockene verdampft, der Rückstand mit 200 ccm Wasser aufgenommen, durch Zusatz von Weinsäure auf einen Gehalt von 1% dieser gebracht, um Bakterienverunreinigung hintanzuhalten, und unter Zusatz von 2 g frischer Preßhefe drei Tage lang bei 30° vergoren. Eine Probe dieser Gärflüssigkeit wurde mit 0,5 g Natriumacetat versetzt, um der hydrolytischen Wirkung der Weinsäure vorzubeugen, und die Nitrite wieder mit Harnstoff zerstört. Darauf wurde zur Vertreibung des durch die Gärung gebildeten Alkohols zur Trockne verdampft, und der in 50 ccm Wasser aufgenommene Rückstand mit 0,3 g Phenylhydrazinchlorhydrat $1\frac{1}{2}$ Stunden im siedenden Wasser erhitzt. Hierbei bildete sich kein unlösliches Osazon mehr, ein Beweis, daß alle Glukose vergoren war. Darauf wurde der Rest der Gärflüssigkeit ebenso und zwar mit 3 g Natriumacetat, 2 g Harnstoff und 2 g Phenylhydrazinchlorhydrat behandelt. Nach dem $1\frac{1}{2}$ stündigem Erwärmen im siedenden Wasser wurde zum Kochen erhitzt, worauf beim Erkälten das Osazon des Disaccharids ausfiel. Es wurde abgesaugt, in der Reibschale zuerst mit Wasser und dann mit Chloroform ausgeknetet, nach dem Absaugen einmal aus wenig

Wasser umkrystallisiert, mit Äther gewaschen und getrocknet. Erhalten wurden 0,35 g vom Schmelzpunkt 165°. Das Osazon wurde dann in 200 ccm Essigäther gelöst und mit Petroläther ausgefällt. Die so gereinigten 0,2 g zeigten nun den Schmelzpunkt von 198°, der von Skraup und König für das Cellobiosazon angegeben wurde.

Um den Mischschmelzpunkt zu kontrollieren und die Drehung der aus Papier durch Acetylierung erhaltenen Cellobiose als Osazon zu bestimmen, wurde dieses dargestellt und in derselben Weise gereinigt.

Es zeigte den Zersetzungspunkt von 198° und analysierte: 0,1226 g Subst. 11 ccm N bei 17° und 759 mm.

Theorie 10,77% N, gefunden 10,42% N.

0,1 g dieses Osazons in einer Mischung von 2 ccm Pyridin und 3 ccm absolutem Alkohol drehte bei Beleuchtung mit Auergaslicht im 1 dm-Rohr — 0,36° ± 0,04° nach links.

Der Mischschmelzpunkt dieses Osazons mit dem durch den fermentativen Abbau erhaltenen zeigte am selben Thermometer mit dem durch Acetylierung erhaltenen Osazon den Zersetzungspunkt von 198°.

Das Osazon des fermentativen Abbaus analysierte: 0,1605 g Subst. 14,6 ccm N bei 15° und 756 mm.

Theorie 10,77% N, gefunden 10,61% N.

Eine andere, auf fermentativem Weg ebenso erhaltene Probe drehte: 0,1 g in 5 ccm Pyridinalkohol — 0,30° ± 0,02° nach links.

Spaltung mit Emulsin.

Die Versuchsanstellung war hier zuerst genau dieselbe. 10 l Nährflüssigkeit mit 0,05% Ba(NO₃)₂ und 2% alte Cellulose. Beimpft am 2. XI. 10., Toluolzusatz am 6. XI., abgedampft am 9. XI. Nach der Vergärung mit Hefe wurde zuerst nachgewiesen, daß kein Glukosazon mehr gebildet wurde, und demnach alle Glukose vergoren war. Der Abdampfrückstand wurde dann mit 40 ccm Wasser aufgenommen, und davon 5 ccm ohne und 35 ccm mit Zusatz von 1 g Emulsin (Kahlbaum) bei Toluolzusatz zwei Tage lang bei 37° gehalten. Die 5 ccm erhielten einen Zusatz von 0,5 g Natrumacetat, 0,2 g Harnstoff

und 0,3 g Phenylhydrazinchlorhydrat, die 35 ccm 2 g Natriumacetat, 1 g Harnstoff und 1,5 g Phenylhydrazinchlorhydrat. Die 35 ccm wurden vor Zugabe des Phenylhydrazins, aber nach dem Aufkochen mit dem Natriumacetat zur Entfernung des Emulsins abgesaugt. Nach dem Erhitzen im Wasserbade wurde in der 5 ccm-Probe keine Spur von schwerlöslichem Osazon gebildet, ein Beweis, daß Glukosazon nicht vorhanden war. Dagegen gab die emulsinhaltige Probe fast nur schwerlösliches Osazon, das durch Auskochen mit Wasser von den geringen Mengen des ihm noch anhaftenden aus der noch ungespaltenen Cellobiose — die Spaltung ist nie quantitativ, vgl. Bertrand und Holderer — gebildeten Osazons befreit wurde. Nach dem Umkrystallisieren aus 50% igem Alkohol wurde 0,3 g des schwerlöslichen Osazons erhalten, die sich bei genau 205° zersetzten und sich auch durch die Analyse als Glukosazon erwiesen:

0,1503 g Subst gaben 20,0 ccm N bei 16° und 759 mm.

Theorie 15,64% N, gefunden 15,51% N.

0,0522 g dieses Osazons drehten in 5 ccm Pyridinalkohol im 1 dm-Rohr — 0,74 ± 0,02 nach links. Daraus berechnet sich für 0,1 g in 5 ccm Pyridinalkohol (die darin nicht zur Lösung zu bringen waren), — 1,42°, was mit dem von Neuberg erhaltenen Wert von — 1,50° übereinstimmt.

Es war also durch das Emulsin aus der Cellobiose Glukose abgespalten worden. Genau dasselbe Resultat wurde mit Emulsin-Merck, erhalten.

B. Der Celluloseabbau durch die Methangärungs- bakterien.

Die Methangärung der Cellulose wurde nach den Angaben von Omelianski¹⁾ eingeleitet. Daß hierbei eine Methangärung und nicht eine Wasserstoffgärung der Cellulose in Gang gekommen war, mußte durch eine Analyse der Gärgase bewiesen werden. Sie wurden zu diesem Zweck über Wasser aufge-

¹⁾ W. Omelianski, Lafars Handbuch der technischen Mykologie, Jena 1904/06, Bd. 3, S. 245.

fangen und gasanalytisch untersucht. Die Gärgase enthielten 66% Methan.

Nachweis der Glukose.

13 g schon einmal zu einer Methangärung verwandter Cellulose wurden zusammen mit 5 g CaCO_3 in 4 l Leitungswasser, die 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 g K_2HPO_4 und 0,1 g $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$ enthielten, aufgeschwemmt und am 4. II. 11. mit einer in starker Gärung befindlichen Kultur beimpft. Am 8. II. war die Gärung stark im Gange. Es wurde, immer bei 37° , Toluol zugegeben. Am 11. II. war noch keine Reduktion der Nährflüssigkeit bemerkbar, am 14. II. trat sie ein. Hierauf wurde die filtrierte Lösung stark eingedampft, mit Alkohol gefällt und das alkoholische Filtrat zur Trockne verdampft. Der Abdampfungsrückstand wurde in 20 ccm Wasser aufgenommen und mit 5 g Phenylhydrazinchlorhydrat und 8 g Natriumacetat $1\frac{1}{2}$ Stunden im siedenden Wasser erhitzt. Dann mußte mit 130 ccm Wasser aufgeköcht werden, um die Osazone zur Krystallisation zu bringen. Es wurde eine reichliche Menge des Osazongemisches erhalten, das durch Auskochen mit 100 ccm Wasser vom löslichen Osazon befreit wurde. Der fünfte Teil des schwerlöslichen Osazons gab nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol 0,6 g vom Zersetzungspunkt 205° , die einen auf das Glukosazon stimmenden Stickstoffgehalt ergaben.

0,2133 g Subst. 29,0 ccm N bei 19° und 762 mm.

Theorie 15,64% N, gefunden 15,68% N.

0,05 g des Osazons in 5 ccm Pyridinalkoholgemisch drehten im 1 dm-Rohr $0,63^\circ \pm 0,03^\circ$ nach links. Berechnet für 0,1 g in 5 ccm — $1,26^\circ$. Theorie — $1,50^\circ$.

Auch in diesem Falle war neben dem Glukosazon ein in Wasser lösliches Osazon erhalten worden. Doch wurde auf seine genauere Identifizierung, ebenso wie bei den zunächst zu beschreibenden Abbauversuchen mit Wasserstoffgärern der Cellulose, verzichtet. Bei den Thermophilen sind diese Versuche wieder aufgenommen worden.

C. Der Celluloseabbau durch die Wasserstoffgärungsbakterien.

Die Wasserstoffgärung der Cellulose war durch Beimpfung mit Schlamm aus dem Paulsborner See erhalten worden (vgl. die Mitteilungen der DLG., I. c.). Jedoch waren die Gärgase nicht völlig frei von Methan. Sie enthielten 71,3 % CO_2 , 21,3 % H_2 und geringe Mengen Methan und Stickstoff.

Nachweis der Glukose.

Angewandt 20 g Papier, 5 g CaCO_3 , 3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 5 l Leitungswasser. Beimpft am 1. Febr. 1912. Mit Toluol geschüttelt am 6. Febr. Reduktion war am 12. Febr. zu bemerken, woraufhin wie früher, nur mit der Abänderung verarbeitet wurde, daß die Kalksalze in der alkoholischen Lösung noch mit Schwefelsäure gefällt und das Filtrat dann unter Zusatz des Natriumacetats eingedampft wurde. Beim Eindampfen ging die Hauptmenge der durch die Schwefelsäure in Freiheit gesetzten aus der Gärung stammenden Fettsäuren fort. Der Zusatz des Natriumacetats diente dazu, den geringen Überschuß an Schwefelsäure unschädlich zu machen. Nach diesem Verfahren wurde in letzter Zeit immer gearbeitet. Die Wasserstoffgärung war verhältnismäßig wenig energisch verlaufen. Die Folge davon war, daß auch die Menge der erhaltenen Ozazone hinter den bei der Methangärung isolierten zurückblieb.

Ausbeute 0,2 g Glukosazon vom Schmelzpunkt 205° .

0,1201 g Subst. gaben 15,7 ccm N bei 18° und 770 mm.

Theorie 15,64 % N, gefunden 15,32 %.

D. Der Celluloseabbau durch thermophile Bakterien.

Die thermophile Zersetzung der Cellulose wurde nach den Angaben von Macfayen und Blaxall¹⁾ eingeleitet, wobei Pferdemist als Impfmateriel in Anwendung kam. Schon nach zwei Tagen setzte die unter starker Gasabgabe vor sich gehende

¹⁾ Macfayen und Blaxall, Transactions of the Jenner Institut of Preventive Med., 2. Serie, 1899, S. 182.

Gärung ein.¹⁾ Bei Anwendung von organisch gebundenem Stickstoff als Stickstoffquelle konnte eine beliebige Zahl von Uimpfungen bei 60° vorgenommen werden.

Nachweis der Glukose und der Cellobiose.

15 g Filtrierpapier und 2 g CaCO₃ wurden in einer Lösung von 0,01 g K₂HPO₄, Spuren von MgSO₄ + 7 H₂O und eines Maggi-Bouillonwürfels (enthaltend 0,1436 g N) in 4 l Leitungswasser aufgeschwemmt (der Maggiwürfel enthielt keine reduzierenden Substanzen). Nach sechstägiger Gärung bei 55° wurde 1 g Jodoform gelöst in 100 ccm Aceton zugesetzt und am folgenden Tage nach Filtration stark eingedampft, mit Alkohol gefällt und das Filtrat der Salze zur Trockne verdampft. Der Trockenrückstand wurde in 30 ccm Wasser aufgenommen und mit 6 g Phenylhydrazinchlorhydrat und 9 g Natriumacetat ³/₄ Stunden in siedendem Wasser erhitzt. Das Osazongemenge fiel hierbei gleich krystallinisch aus. Es wurde nach dem Abkühlen abgesaugt und mit Wasser ausgekocht. Das lösliche Osazon zeigte nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Wasser schon den Zersetzungspunkt von 195°. An unlöslichem Osazon wurden nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol 0,35 g erhalten, die sich bei 205° zersetzten.

0,1812 g Subst. gaben bei 22° und 766 mm 24,8 ccm N
Theorie 15,64% N, gefunden 15,63% N.

In einem andern Versuch wurden aus einer 6 l-Gärung einen Tag nach dem Versetzen mit Thymol 0,3 g Glukosazon und 0,4 g Cellobiosazon erhalten. Das Verhältnis von Cellobiose zu Glukose ist also bei der thermophilen Zersetzung ein günstigeres, besonders wenn man berücksichtigt, daß bei der Darstellung des löslichen Osazons weit mehr als bei der des schwerlöslichen verloren geht. Wurde die Hydrolyse aber während zwei Tagen bestehen gelassen, so konnte nur noch wenig Cellobiosazon gewonnen werden, ein Beweis, daß die Cellobiose bei der hohen Temperatur schnell gespalten wird.

¹⁾ Genaueres über den Verlauf dieser Gärung werde ich im Zentralblatt f. Bakt., II. Abt., mitteilen.

Nach dem Auskochen mit Ligroin zeigte das Cellobiosazon den Zersetzungspunkt von 195° .

0,0734 g Subst. gaben bei 21° und 767 mm 6,8 ccm N.

Theorie 10,77% N, gefunden 10,66% N.

0,1 g in 5 ccm Pyridinalkoholgemisch drehten im 1 dm-Rohr bei Beobachtung mit Auerlicht — $0,35^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$, Theorie $0,36^{\circ}$.

Nachweis der Cellobiose.

Es war noch der Beweis zu führen, daß auch in diesem Falle ein durch Hefe nicht vergärbbares Disaccharid entsteht. Deshalb wurde in 2 l Nährflüssigkeit genau wie vorher verfahren, die Glukose aber in schwach weinsaurer Lösung mit $\frac{1}{2}$ g Hefe bei 30° vergoren, ehe die Osazone dargestellt wurden. In der Tat erwies sich das erhaltene Osazon als wasserlöslich. Es war demnach frei von Glukosazon und analysierte wie folgt:

0,0774 g Subst. gaben 7,2 ccm N bei 16° und 749 mm.

Theorie 10,77% N, gefunden 10,93% N.

Termophile Wattezersetzung.

Aus 2 l Nährflüssigkeit konnte einen Tag nach dem Anhalten der Gärung vermittelst Jodoform 0,2 g Glukosazon gewonnen werden. Schmelzpunkt 205° .

E. Einfluß der Temperatur auf den Celluloseabbau.

In allen bisher angeführten Versuchen und den zahlreichen orientierenden, welche ihnen als Wegweiser dienten, wurde der hydrolytische Abbau bei der für die Entwicklung und die Gärung der verschiedenen Cellulosezer-setzer optimalen Temperatur vorgenommen. Mit anderen Worten heißt das, daß die Kulturen nach Zusatz des Antiseptikums zum Zwecke der Ansammlung der intermediären Spaltungsprodukte bei der Denitrifikation, der Methan- und der Wasserstoffgärung bei 37° , bei der thermophilen Zersetzung bei 55° aufgestellt wurden. Um die Temperaturgrenzen der Wirksamkeit der Cellulose zu erforschen, eignete sich am besten die thermophile Gärung, da sie am reichsten an Abbauf fermenten ist. Es wurden daher solche Gärungen bei 55° eingeleitet, dann aber nach Jodoform-

zusatz oder auch ohne Beigabe irgend einer gärungshemmenden Substanz sofort bei anderen Temperaturen aufbewahrt. Unterhalb der geeigneten Temperatur für die Entwicklung der thermophilen Cellulosezersetzer wurde so bei 10° in mehreren Versuchen gar keine Reduktion der Fehlingschen Lösung mehr erhalten. Das Ferment kann also bei dieser Temperatur keine nachweisbare Spaltung der Cellulose mehr vollziehen. Bei 20° war nach 24 Stunden deutliche Reduktion wahrzunehmen und aus 2 l der wie gewöhnlich zusammengesetzten Verdauungsflüssigkeit wurde 0,25 g Glukosazon neben geringen Mengen des Osazons der Cellobiose isoliert. Aber schon durch die bloße Abkühlung auf 20° wird auch ohne Zugabe gärrhemmender Stoffe eine völlige Sistierung der Vergärung erreicht, wobei sich die hydrolytischen Abbauprodukte anhäufen. Aus 1/2 l der Hydrolyseflüssigkeit konnte hier nur 0,015 g Glukosazon vom Schmelzpunkt 205° gewonnen werden, weil das Anhalten der Gärung durch die Abkühlung offenbar nicht so ruckweise gelingt wie durch das Jodoform, sodaß noch ein Teil der Abbauprodukte durch Vergärung verloren geht.

Oberhalb der geeigneten Gärtemperatur von 55° wurde über 70° keine Reduktion mehr erhalten, wenn nach Jodoformzusatz bei dieser Temperatur aufbewahrt wurde. Die Wirksamkeit der Cellulase wird also hier aufgehoben. Dagegen ist das Ferment bei 67° noch wirkungskräftig, wenn auch in geschwächtem Maße. Die Cellobiase dagegen verliert bei diesem Temperaturgrad ihre Spaltungskraft. Deshalb konnte der Abbau bei der Cellobiose angehalten und ohne vorherige Vergärung mit Hefe ein vom Glukosazon freies, in Wasser lösliches Cellobiosazon isoliert werden. Aus 2 l Verdauungsflüssigkeit wurden davon 0,05 g erhalten, die wie folgt analysierten:

0,009148 g Substanz gaben 0,81 ccm N bei 18° und 756 mm.

Theorie 10,7% N, gefunden 10,4% N.

Die Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft hat mich in der Ausführung dieser Arbeit durch Bewilligung von Mitteln unterstützt. Ihr, sowie Herrn Dr. Langhans, der mir mit Geschick zur Seite stand, bin ich zu Dank verpflichtet.