

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.

VI. Mitteilung.

Zur Kenntnis der Säurebildung bei einigen Mikroorganismen.

Von

Hans Euler und Hermann Meyer.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. Juli 1912.)

Durch vorhergehende Arbeiten wurden bei der Bierhefe zwei Fälle von Enzyymbildung quantitativ untersucht. Nämlich erstens die Bildung von Invertase,¹⁾ eines Enzyms, welches an das Plasma nur in geringem Grade gebunden ist. Durch geeignete Vorbehandlung wurde bei der Untersuchung unserer Hefe H eine Verzehnfachung der Invertasewirkung erreicht. Andererseits hat sich gezeigt, daß diese Enzyymbildung nicht von der Gegenwart des spezifischen Substrates in der Lösung abhängt. Im Gegensatz hierzu tritt eine Beschleunigung der Galaktosevergärung, also eine Vermehrung der «Galaktase» nur dann ein, wenn die Hefe mit einer galaktosehaltigen Nährlösung vorbehandelt wird.²⁾ Wir haben also, wie schon früher betont wurde,³⁾ mit zwei verschiedenen Enzyymbildungsvorgängen zu tun.

Der weitere Gedankengang unserer Untersuchungen war folgender:

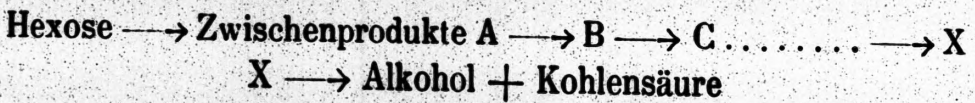
Die alkoholische Gärung wird, wie wohl zum erstenmal Buchner und Meisenheimer hervorgehoben haben, nicht

¹⁾ Euler und af Ugglas, Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 279, 1911. — Euler und Johansson, Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 388, 1912. — Euler und Meyer, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 274, 1912.

²⁾ Euler und Johansson, Diese Zeitschrift, Bd. 78, S. 246, 1912.

³⁾ Euler und Meyer, l. c.

durch ein einzelnes Enzym, sondern durch einen Enzymkomplex hervorgerufen. Da die einzelnen Phasen der alkoholischen Gärung noch nicht aufgeklärt sind, lassen sich über die beteiligten Enzyme auch noch keine Angaben machen. Es hatte sich aber gezeigt, daß bei der Gärung durch lebende Hefe eine ziemlich große Differenz $\Delta-C$ auftritt¹⁾ zwischen dem verschwundenen Zucker, gemessen durch die Drehungsänderung der Lösung, und der entweichenden Kohlensäure C, eine Differenz, welche so gedeutet wurde, daß in einer Folge von Reaktionen, welche sich durch das Schema darstellen lassen:



einerseits der Zucker verbraucht wird, andererseits ein Zwischenprodukt X in Alkohol und Kohlensäure zerfällt. Es war versucht worden, diese beiden Vorgänge der Gärung dadurch voneinander zu trennen, daß verschiedene Katalysatoren zugesetzt wurden, in der Erwartung, daß dieselben die beiden Reaktionen in verschiedenem Grade beschleunigen würden.²⁾

Dies ist allerdings bis zu einem gewissen Grad gelungen, da aber Folgereaktionen vorliegen, von welchen die letzte um so schneller verläuft, je mehr Produkte die erste nachliefert, so wird keine weitgehende Trennung erreicht.

Wir haben uns nun zur Orientierung einer Gruppe von Reaktionen zugewandt, wo ein Substrat in verschiedener Richtung gespalten wird. Dies ist der Fall bei Pilzen, wo neben der alkoholischen Gärung auch eine Bildung von Säuren eintritt. Nach den Angaben der Literatur bleibt diese Säurebildung bei gewissen Arten ganz aus, und soll bei anderen durch geeignete Nahrungsverhältnisse hervorgerufen werden.

Abgesehen von der praktischen Bedeutung, welche die Säurebildung in gewisser Hinsicht besitzt, scheint für das Studium der Enzyymbildung und Anpassung dieser Fall ausgesprochene Vorteile zu bieten. Insbesondere ist er analytisch leicht zu verfolgen.

¹⁾ Euler und Johansson, Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 347, 1912.

²⁾ Euler und Th. Berggren, Zeitschr. f. Gärungsphysiol., Bd. 1, S. 204, 1912.

Mit den Gärungsreaktionen ist diese Säurebildung nur insofern verknüpft, als vermutlich eines der Zwischenprodukte der Gärung, etwa ein dem Dioxyaceton nahestehender Stoff oder Acetaldehyd, also die nächsten Vorstufen des Alkohols und der Kohlensäure die Substrate für die als Endprodukte auftretenden Säuren liefern.

Nach den Angaben der Literatur scheint unter den säurebildenden Bakterien *Bacterium coli* besonders ausgeprägte Fälle von Funktionsveränderungen bei verschiedenartiger Züchtung darzubieten. Wir erinnern unter anderen an die neueren interessanten Untersuchungen von Burri,¹⁾ nach welchem gewisse Stämme des genannten Bakteriums bei der Kultur auf sogenannten Endplatten zunächst weiße Kolonien bilden, welche Milchzucker nicht vergären, während nach einiger Zeit eine rote Form auftritt, welche die Fähigkeit der Milchzuckervergärung erlangt hat und nun konstant beibehält.

Einen andern Fall haben Grimbert und Legros²⁾ beschrieben. Ihre Arbeit war veranlaßt durch frühere Befunde, nach welchen *Bacterium coli* so gezüchtet werden kann, daß er seine charakteristischen Eigenschaften (Vergärung der Lactose, Bildung von Indol usw.) verliert und sich die Eigenschaften des *Bacterium Typhi* aneignet. Von fünf Stämmen von Colibakterien verschiedener Herkunft, welche auf verschiedenen Nährböden gezüchtet wurden, verloren zwei das Vermögen, Indol zu bilden. Von diesen behielt eine die Fähigkeit bei, Lactose zu vergären. Diese Art machte eine 5% Lactose und 2% Pepton enthaltende Flüssigkeit sauer, wogegen der Typhusbacillus sich gegen die Lactose indifferent verhielt und in derselben Nährflüssigkeit alkalische Reaktion hervorbrachte.

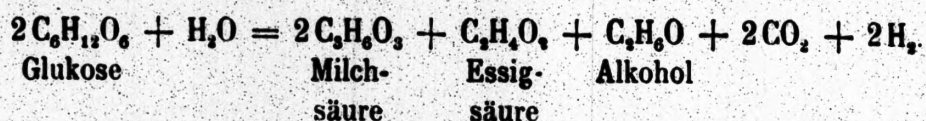
Wenn einerseits die Säurebildung nach einzelnen Angaben bei verschiedenen Rassen des *Bacterium coli* stark variieren kann, so ist andererseits zu berücksichtigen, daß nach den Ergebnissen von Harden und Young,³⁾ welchen man zweifellos die beste Untersuchung über die Chemie der Kohlenhydratgärung

¹⁾ Zentralbl. f. Bakt. (2), 28, 1911.

²⁾ J. Pharm. Chem. (6), Bd. 13, S. 107, 1901.

³⁾ Journ. chem. Soc., Bd. 79, S. 625, 1901.

durch *Bacterium coli* verdankt, die Spaltung der d-Glukose und d-Fruktose sich durch eine konstante Formel von folgender Art darstellen läßt:



Es fragt sich also: Kann der Betrag der Säurebildung im Vergleich zum Betrag des vergorenen Zuckers¹⁾ verändert werden und durch welche Mittel?

Falls hier die Säurebildung durch geeignete Kulturbedingungen unterdrückt werden kann, so liegt hier ein weiterer Fall vor, wo eine ganze Reaktionsfolge durch die Veränderung eines Enzyms beeinflußt wird. Etwas Ähnliches tritt offenbar bei der alkoholischen Gärung mit solchen Hefen auf, bei welchen die Wirksamkeit der Phosphatase erniedrigt ist.

Obige Frage ist von allgemeiner Bedeutung. Denn es ist natürlich für die chemische Bakteriologie wesentlich, ob solche Gärungsgleichungen komplizierterer Art konstant sind, oder in welchem Umfange eine Reaktion auf Kosten einer anderen wachsen kann. Erweist sich eine solche Formel, wie die obige von Harden und Young aufgestellte, konstant, sei es für eine Art oder für eine Rasse, so wird man einer derartigen zusammenfassenden Darstellung der chemischen Wirksamkeit die größte Aufmerksamkeit zuzuwenden haben. Ist ferner die chemische Wirksamkeit einer Rasse durch eine solche Formel darstellbar, so besagt dies, daß die Enzyme der verschiedenen Reaktionen voneinander abhängig sind, und man wird annehmen, daß die betreffenden Enzyme Teile des Plasmas sind, welches in noch unbekannter Weise die Geschwindigkeit der verschiedenen Einzelreaktionen zu regulieren imstande ist.

Es wird sich also zunächst darum handeln, nachzusehen, ob *Bacterium Coli commune* verschiedener Herstammung einer und derselben zusammenfassenden Reak-

¹⁾ Harden und Young geben an, daß die Menge der gebildeten Milchsäure die halbe Menge des vergorenen Zuckers nie überschreitet, wohl aber geringer sein kann.

tionsformel folgt, wobei zunächst die Formel von Harden und Young zu berücksichtigen ist.

Unser Bacterium Coli communi stammt aus einer Reinkultur des hiesigen Laboratoriums und war zweimal auf eine 1%ige Jodkalium-Kartoffel-Gelatine übergeimpft worden. Eine Platinöse dieser Kultur wurde in 10 ccm sterilem Wasser aufgeschlämmt, und je 2 ccm dieser Aufschlammung in 50 ccm folgender Nährlösung gebracht.

Asparagin	1,0 g	Kochsalz	0,5 g
Lactose	2,0 g	Wasser	96,5 g

Die Reaktion ging bei 36,5° im Thermostaten in mit Meissl-Ventil versehenen Erlenmeyer-Kolben vor sich. Die Ergebnisse gehen aus folgenden Tabellen hervor.

A. Entwickeltes Gas.

Gewicht der Versuchskolben in Gramm.

Kolben	Nach 0 Std.	Nach 15,5 Std.	Nach 39 Std.	Nach 88 Std.
1	121,0642	121,0620	—	—
2	122,4960	122,4914	122,4900	—
3	112,2470	112,2450	112,2450	112,2450

B. Je 50 ccm erfordern zur Neutralisation:

Nach 0	Stunde	7,8 ccm	0,1060 n HCl
» 15,5	»	5,8 ccm	» » »
» 39	»	2,6 ccm	0,1177 n NOH
» 88	»	8,2 ccm	» » »

Die Flüssigkeit, in welcher Bacterium coli wuchs, war etwa im Anfang 0,016 norm. alkalisch und wurde dann 0,0019 norm. sauer.

Es zeigt sich, daß also so gut wie gar keine Gasbildung eingetreten ist, wogegen der Säuretiter sich stark vermehrt hat. Es wurde festgestellt, daß keine zweibasische Säuren wie Oxalsäure oder Bernsteinsäure gebildet worden waren.

Was den Betrag der gebildeten Säure betrifft, so liegt zum Vergleich eine ganz neue Arbeit von A. Fischer und E. Buch-

Anderssen¹⁾ vor. Wie diese Verfasser hervorheben, ist die Säurebildung das wichtigste differenzialdiagnostische Mittel zur Untersuchung der Coligruppe. Aus ihren orientierenden Versuchen ging hervor, daß die Versuchsbedingungen absolut gleich sein müssen, wenn man vergleichbare Resultate erhalten will, und besonders ist die Menge und Zusammensetzung sowie die Temperatur der Nährlösung maßgebend. Ihre Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

Witte-Pepton	1,0 g	Kochsalz	0,5 g
Laktose	2,0 g	Wasser	96,5 g

Wir geben einen Auszug aus der Tabelle von Fischer und Buch-Andersen, umgerechnet auf die Normalität der bakterienhaltigen Lösung.

Stunden	Normalität
0	0,008
24,4	0,0022
46,2	0,012
74,6	0,017
121,3	0,019
152,6	0,021
178,8	0,018

Es wurde also von unserem *Bacterium coli* sehr angenähert der gleiche Säuerungsgrad erreicht wie von der Kultur der dänischen Beobachter.

Unsere Nährlösung war ungefähr 0,11 normal in bezug auf Lactose = 0,22 normal in bezug auf Hexosen. Unter der Annahme, daß — nach der Gleichung von Harden und Young — aus einem Molekül Hexose 1,5 Äquivalente organischer Säuren entstehen,²⁾ würde etwa $\frac{1}{10}$ des Zuckers zur Säurebildung verbraucht worden sein.

Dagegen ist die Gasentwicklung, wie aus der ersten Tabelle hervorgeht, minimal. Unter der Annahme, daß die ge-

¹⁾ Zentralbl. (2), Bd. 33, S. 289, 1912.

²⁾ Und unter der Annahme, daß nur der Zucker der Nährlösung, nicht aber das Asparagin zur Säurebildung verbraucht wurde.

samte Gasmenge in CO_2 bestand, ist höchstens $\frac{1}{100}$ der zur Verfügung stehenden Hexosen nach der Gleichung der alkoholischen Gärung zerlegt worden.

Was aus unseren bis jetzt angestellten Messungen sicher hervorgeht, ist, daß unsere Rasse von *Bacterium coli* Säuren und Kohlendioxyd in einem anderen Verhältnis bildet als die von Harden und Young untersuchte.

Auf die Abhängigkeit der Bildung fester und flüchtiger organischer Säuren von mit der Bildung von Alkohol und Kohlensäure und auf den Zusammenhang der verschiedenen Gärungsenzyme bei *Bact. coli* werden wir bald zurückkommen.

II.

Messungen an *Mucor mucedo*.

Der von uns untersuchte *Mucor mucedo* entstammte der Sammlung von Král in Prag. Er wurde von der Gelatinekultur aus direkt auf die Uschinsky-Fränkelsche Nährlösung übergeimpft. Diese Lösung, welche Teichert¹⁾ empfiehlt, hatte folgende Zusammensetzung.

NaCl	5 g	Ammoniumlactat	6
KH_2PO_4	2 g	Wasser	1000
Asparagin	4 g	+ verdünnte Natronlauge bis zur deutlich alkalischen Reaktion.	

Teichert erwähnt, daß nach etwa drei Tagen die Pilzentwicklung beginnt und nach 6 tägigem Stehen sich eine leichte Decke auf der Oberfläche der Flüssigkeit bildet. Nach 20 Tagen ist die Decke sehr stark geworden und zeigt eine außerordentlich schöne Rosafärbung. Die Flüssigkeit blieb klar und enthielt submerse Mycelien. Die Acidität der Lösung hatte eine geringe Zunahme erfahren, während bei der Züchtung auf andern Zuckerarten eine Zunahme der Alkalinität eingetreten war.

Mit diesen Angaben von Teichert²⁾ stimmen unsere eigenen Beobachtungen überein.

¹⁾ Milchzeitung, Bd. 31, S. 801, 1902.

²⁾ Vgl. auch die ausgezeichnete Monographie von Wehmer über *Mucoraceengärungen* in Lafars Handbuch, Bd. IV.

Invertierungsversuch.

0,05 g *Mucor mucedo* werden in 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung und 10 ccm 1%iger NaH_2PO_4 -Lösung aufgeschlämmt, 40 Min. stehen gelassen und alsdann durch Zusatz von 10 ccm 5%iger Sodalösung inaktiviert.

Drehung	Minuten
7,90	0
7,90	40

Es hatte also keine Inversion stattgefunden.

Gärungsversuche.

Je 0,05 g lufttrockener *Muco mucedo* wurden in 25 ccm 10%iger Zuckerlösung (Glykose, Maltose und Rohrzucker) aufgeschlämmt und bei 30,5 in Thermostaten zur Vergärung gestellt. Die Vergärungsgeschwindigkeiten der drei Zuckerarten verhielten sich wie 3,0 : 0,8 : 0,3. Die Messungen der Gärungsgeschwindigkeit war hierbei nach der volumetrischen Methode geschehen.

Ein weiterer Versuch wurde ausgeführt, indem gleichzeitig durch Wägung das entweichende CO_2 und durch Titration die Acidität der Lösung gemessen wurde.

Je 0,05 g lufttrockener *Muco mucedo* wurden in 10 ccm 10%iger Glukoselösung aufgeschlämmt und in Erlenmeyer-Kolben bei etwa 19° zur Vergärung gestellt. Der ganze Inhalt der Kolben wurde titriert.

	Gewichtsverlust in g nach					Acidität erforderlich ccm 0,1177 n-NaOH nach		
	27 Std.	47 Std.	70 Std.	98 Std.	145 Std.	0 Std.	72 Std.	145 Std.
0	—	—	—	—	—	0,2	—	—
1	0,0025	0,0120	0,0125	0,0170	0,0220	—	—	3,0
2	0,0045	0,0140	0,0175	—	—	—	1,25	—
3	0,0030	0,0100	0,0105	0,0150	0,0160	—	—	—
4	0,0045	0,0120	0,0175	0,0215	0,0275	—	—	—

Nach 145 Stunden war also die Lösung, in welcher der *Mucor* gärte, 0,035 normal in bezug auf Säure. Einer Angabe

von Brefeld zufolge wird bei diesem Pilz eine Acidität von etwa 0,04 erreicht.

Nach Graf²⁾ werden in der gleichen Zeit annähernd gleiche Äquivalente CO_2 und einer einbasischen Säure entwickelt.

In einem weiteren Versuch wurde zu ermitteln gesucht, wie die Bildung der Säure gesteigert werden kann, wenn dieselbe durch Gegenwart von Calciumcarbonat festgelegt wird.

Je vier Kolben mit 25 ccm 10%iger Glukoselösung wurden mit 0,2 g gefälltem CaCO_3 und 0,1 g lufttrockenem *Mucor mucedo* versetzt und längere Zeit bei 18° stehen gelassen. Die folgende Tabelle gibt den Gewichtsverlust der 4 Kolben in Gramm an, also die Anzahl Gramm entwickelter Kohlensäure.

	Gewichtsverlust (g) in Stunden.				
	18	64	72	88	138
1	0	0,0400	0,0500	0,0600	0,0990
2	0	0,0400	0,0520	0,0670	0,1040
3	0	0,0470	0,0590	0,0810	0,1320
4	0	0,0455	0,0575	0,0765	0,1255
					<u>0,4605 g CO_2</u>

Nach 138 Stunden wurde der Inhalt der 4 Kolben vereinigt und einige Zeit gekocht, um gebildetes Bicarbonat zu zersetzen. Nach dem Erkalten wurde filtriert und das Filtrat auf 300 ccm aufgefüllt. 100 ccm dieses Filtrates lieferten bei der Ca-Bestimmung 0,1255 g CaO , mithin entspricht der Ca-Gehalt der 300 ccm 0,67 g CaCO_3 . Es wurden also von 0,8 g CaCO_3 0,67 g an organische Säuren gebunden.

Anhang.

Einige Versuche mit Soorpilz.

P. Lindner hat vor kurzer Zeit³⁾ mehrere interessante Angaben gemacht über das Verhalten des Soorpilzes gegen die

¹⁾ Landw. Jahrbücher, Bd. 5, S. 282, 1876.

²⁾ Jahresbericht d. Lehr- und Versuchsstation München. Brauer-Akademie 1899/1900, S. 28. Zitiert nach Wehmer, Mucoraceengärung in Lafars Handbuch, 4. Bd., S. 455 u. ff.

³⁾ Wochenschr. f. Brauerei, Bd. 28, S. 61, 1911. — Zur Systematik des Soorpilzes siehe C. H. Plaut, Leipzig, H. Voigt, 1887.

verschiedenen Zuckerarten bei verschiedenen Temperaturen. Bei dem an höhere Temperaturen angepaßten Pilz ist die Vergärung der Xylose nur bei höheren Temperaturen zu erzielen gewesen, nicht bei 25°, «obwohl bei dieser Temperatur andere Zuckerarten in Gärung kamen, Zymase also vorhanden war».

Nach Versuchen über Pentosengärung, mit welchen wir in den letzten Jahren hier beschäftigt waren, ist es indessen nicht wahrscheinlich, daß die Vergärung der Pentosen unter Mitwirkung der Zymase, also desjenigen Enzymkomplexes geschieht, welcher die Vergärung der Hexosen bewirkt, vielmehr scheint die Pentosengärung ein enzymatischer Vorgang ganz eigener Art zu sein. Zu dem gleichen Ergebnis führten auch einige mit dem Soorpilz ausgeführte Versuche, welche in Rücksicht darauf, daß Herr Lindner diesen interessanten Gärungsfall selbst näher zu studieren beabsichtigt, nicht weiter fortgeführt wurden.

Die Angaben von Lindner, daß der Soorpilz spezifisch Xylose angreift, Arabinose aber nicht, können wir durchaus bestätigen. Interessant ist, daß hier auch die Entwicklung des Pilzes auf Xylose enthaltendem Nährboden viel rascher verläuft als auf einer Nährlösung, welche Arabinose enthält. Dies geht aus folgendem Versuch hervor.

Eine Kultur des Soorpilzes ist uns von Herrn Professor P. Lindner gütigst überlassen worden, welchem wir auch hier unseren besten Dank aussprechen wollen.

Der Pilz wurde von der Reinkultur in eine Lösung von folgender Zusammensetzung übergeimpft:

8 g Ammoniumsulfat	20 g Rohrzucker
6 g NaH_2PO_4	2 l Wasser
15 g Seignettesalz.	

Bei der Versuchstemperatur von 36° zeigte der Pilz in dieser Lösung ein gutes Wachstum.

Nachdem sich der Pilz in dieser Lösung reichlich entwickelt hatte, wurde er durch Filtration von der Nährlösung getrennt, mit Wasser gewaschen und in verdünnten Lösungen teils von Arabinose, teils von Xylose eingetragen. Dieses Verfahren wurde wiederholt, so daß nun die Aufschlammung, in

welcher die Soorpilze sich befanden, vollkommen frei von Hexosen und von Rohrzucker war.

Je 40 ccm einer Lösung, die 3%ig in bezug auf Arabinose resp. Xylose und 0,5%ig in bezug auf KH_2PO_4 war, wurden mit 10 ccm einer Aufschlämmung des Soorpilzes versetzt. In diesen Proben, die sich in mit Meissl-Ventilen versehenen Erlenmeyer-Kolben befanden, wurde teils von Zeit zu Zeit die entwichene Kohlensäure durch Wägung bestimmt, teils wurde der Drehungsrückgang festgestellt und die Anzahl der Zellen in gebräuchlicher Weise durch Zählung in der Zählkammer ermittelt. Diese Methode lieferte beim Soorpilz erheblich zuverlässigere Resultate als die volumetrische Bestimmung der aus der Lösung abzentrifugierten Hefezellen.

Versuch a.

Arabinose.		Xylose.	
Entwicklungszeit in Std.	Zellenzahl in ccm	Entwicklungszeit in Std.	Zellenzahl in ccm
0	53 650	0	54 350
24	53 000	24	57 000
97	53 250	97	60 250

Nach etwa 100 Stunden wurde der Pilz auf neue Mengen der Lösungen, welche einerseits Phosphat und Arabinose, andererseits Phosphat und Xylose enthielten, übergeimpft. Das Ergebnis der Zellenzählung war dann folgendes:

Versuch b.

Arabinose.		Xylose.	
Entwicklungszeit in Std.	Zellenzahl in ccm	Entwicklungszeit in Std.	Zellenzahl in ccm
0	42 000	0	31 700
26	42 900	37	34 800
96	43 000	75	39 050
		124	4 160

In der Arabinose enthaltenden Lösung tritt offenbar gar keine Zellenvermehrung ein. In der Xyloselösung nahm die

Zellenvermehrung mit steigender Entwicklungszeit zu und sie wäre zweifellos noch mehr angewachsen, wenn die Lösung genügende Stickstoffnahrung enthalten haben würde.

Beim Versuch 1a wurde gleichzeitig festgestellt, daß während der Entwicklung von CO_2 eine Bildung fetter Säuren nicht stattfindet.

Besonders bemerkenswert scheint uns die Tatsache, daß in der Xyloselösung des Versuches a ein Drehungsrückgang eintrat, welcher um mehr als 100% den Wert überstieg, den man aus der Menge der gleichzeitig durch Gärung entwickelten Kohlensäure berechnen kann. Es dürfte also hier eine Erscheinung ähnlicher Art vorliegen, wie diejenige, welche Euler und Johansson bei der Vergärung der Glukose durch lebende Hefe studiert haben.¹⁾ Allerdings war bei der Vergärung der Glukose der Wert $\Delta\text{—C}$ prozentisch bedeutend geringer.

Auch bei dem Abbau der Xylose durch Soorpilz scheint also der Entwicklung der Kohlensäure eine Umwandlung in ein schwächer oder gar nicht optisch aktives Molekül voranzugehen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 347, 1912.
