

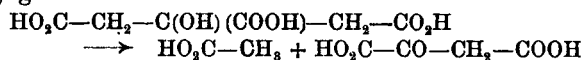
## Die anaerobe Vergärung der Citronensäure durch Bakterien;

von *Michael Deffner*.

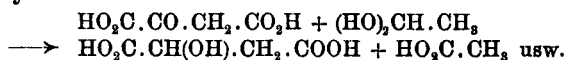
Beim anaeroben Abbau der Citronensäure durch die in Brauereihefe bisweilen sich entwickelnden Bakterien<sup>1)</sup> wurden auf je 1 Mol Citronensäure 1,3—1,8 Mol Essigsäure, 0,1 bis 0,33 Mol Ameisensäure, weniger als 2 Mol CO<sub>2</sub>, 0,11 bis 0,22 Mol Bernsteinsäure und noch weniger Äthylalkohol und Acetaldehyd erhalten<sup>2)</sup>.

Aus rein chemischen Gründen hat man angenommen, daß der Angriffspunkt der enzymatischen Spaltung an die tertiär gebundene Carboxylgruppe zu verlegen sei, die in Gestalt von Ameisensäure abgespalten werde. Die dabei auftretende Acetondicarbonsäure würde dann weiter hydrolytisch in Essigsäure und Kohlensäure zerfallen. Das Auftreten der Bernsteinsäure wurde auf die Dehydrierung von Essigsäure zurückgeführt.

H. Wieland, M. Crawford und H. Walch<sup>3)</sup> haben dann festgestellt, daß diese Bakterien aus Oxalessigsäure CO<sub>2</sub>, Ameisensäure, Essigsäure und Bernsteinsäure bilden. Diese Befunde hatten es wahrscheinlich gemacht, daß die Citronensäure nicht über Ameisensäure und Acetondicarbonsäure, sondern über Essigsäure und Oxalessigsäure gespalten wird, gemäß dem Schema:



Ein Teil der Oxalessigsäure wird weiter über Brenztraubensäure zu Acetaldehyd decarboxyliert. Dieser wird in der Hauptsache zu Essigsäure dehydriert und dabei wird ein Teil der Oxalessigsäure über die Äpfelsäure zu Bernsteinsäure hydriert:



<sup>1)</sup> R. Sonderhoff u. M. Deffner, A. 525, 132 (1936).

<sup>2)</sup> H. Wieland u. R. Sonderhoff, A. 503, 61 (1933); 520, 150 (1935).

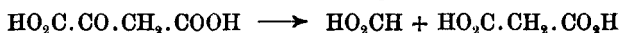
<sup>3)</sup> A. 525, 125 (1936).

Nur ein kleiner Teil des Acetaldehyds wird weiter unter der Wirkung der Mutase zu Alkohol und Essigsäure aufgeteilt.

Die Ameisensäure entsteht entweder aus der Brenztraubensäure:



oder auch direkt aus der Oxalessigsäure:



Die zu erwartende Malonsäure wird als  $\text{CO}_2$  und Essigsäure gefunden.

Eine andere Möglichkeit des Abbaus der Citronensäure führt über Aconitsäure und Isocitronensäure, wie C. Martius<sup>1)</sup> für den aeroben Abbau im tierischen Organismus nachgewiesen hat. Da aber unsere Bakterien die Isocitronensäure sehr schlecht abbauen, halte ich diesen Weg für den anaeroben Abbau durch Bakterien für unwahrscheinlich. Ob dies auch für den aeroben Abbau gilt, bedarf noch weiterer Untersuchung. Sicher ist nur, daß durch unsere Bakterien Isocitronensäure und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure viel langsamer abgebaut werden als Citronensäure.

### Versuche mit wachsenden Bakterien.

#### a) Auf Hefewasser.

Es wurde i. V. in der früher<sup>2)</sup> beschriebenen Weise gearbeitet. Nach 14-stündigem Stehen im Brutschrank bei 32° waren aus 2,8 Mmol *Na-Citrat*, in 100 ccm Hefewasser gelöst, 2,15 Mmol  $\text{CO}_2$ , 2,15 Mmol *Ameisensäure*, 2,65 Mmol *Essigsäure* und 130 mg *Bernsteinsäure* entstanden. Im Leerversuch (ohne Citrat) aus 100 ccm Hefewasser wurden 0,1 Mmol  $\text{CO}_2$ , 0,6 Mmol *Essigsäure*, Spuren von *Ameisensäure* und 43 mg *Bernsteinsäure* gefunden.

Die Menge der Bernsteinsäure des Leerversuches war verhältnismäßig groß, so daß es nicht ausgeschlossen schien, daß auch die Bernsteinsäure des Hauptversuches nicht aus der Citronensäure, sondern aus dem Hefewasser stammt. Die erhöhte Ausbeute könnte sich aus der größeren Menge der gebildeten Bakterien erklären. Um hier klarer zu sehen,

<sup>1)</sup> H. 247, 104 (1937).

<sup>2)</sup> A. 525, 135 (1936).

wurden Versuche mit wachsenden Bakterien auf Mineral-Nährboden mit Citronensäure als einziger Kohlenstoffquelle angestellt.

b) *Auf Mineral-Nährböden.*

1. 2,85 Mmol Na-Citrat wurden in 50 ccm Wasser + 200 ccm einer Nährlösung gelöst, die in 1000 ccm 0,45 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25 g  $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,5 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,12 g KCl und Spuren von  $\text{FeCl}_3$  enthielt. Es wurde mit den Bakterien beimpft, evakuiert und im Brutschrank 66 Stunden bei  $32^\circ$  belassen. Dabei wurden 5,05 Mmol  $\text{CO}_2$ , 3,1 Mmol flüchtige Säuren — davon nur Spuren von Ameisensäure —, keine Bernsteinsäure und 132 mg Citronensäure gefunden.

Dies entspricht auf 1 Mmol Citrat etwa 2,35 Mmol  $\text{CO}_2$  und 1,44 Mmol Essigsäure.

2. 3 Mmol Citrat in 50 ccm Wasser + 100 ccm obiger Nährlösung gelöst. Nach 40-stündigem Stehen im Brutschrank wurden 5,5 Mmol  $\text{CO}_2$ , 0,8 Mmol Ameisensäure, 4,75 Mmol Essigsäure und 0,2 Mmol Bernsteinsäure gefunden. Die gesamte Citronensäure war abgebaut.

Dies entspricht auf 1 Mmol Citronensäure 1,83 Mmol  $\text{CO}_2$ , 1,58 Mmol Essigsäure, 0,27 Mmol Ameisensäure und 0,066 Mmol Bernsteinsäure.

Da bei Gegenwart stickstoffhaltiger Salze je nach den Versuchsbedingungen keine oder nur kleine Mengen Ameisensäure entstehen, bestünde die Möglichkeit, daß diese in  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  gespalten würde. Es wurde deshalb das entwickelte Gas auf Wasserstoff untersucht.

3. 6 Mmol Citrat wurden in 40 ccm Wasser + 160 ccm obiger Nährlösung gelöst. Es wurde mit Bakterien beimpft. Nach 48-stündigem Stehen im Brutschrank wurden 4,08 Mmol  $\text{CO}_2$ , 3,5 Mmol Essigsäure, Spuren von Ameisensäure, 22 mg Bernsteinsäure und 0,4 Mmol Alkohol gefunden. Es war kein Wasserstoff vorhanden. An Citronensäure wurden 760 mg wiedererhalten. Gewicht der Bakterien 78 mg.

Dies entspricht auf 1 Mmol Citronensäure 2,04 Mmol  $\text{CO}_2$ , 1,75 Mmol Essigsäure, 0,1 Mmol Bernsteinsäure und 0,2 Mmol Alkohol. Auch bei weiteren Versuchen wurde kein Wasserstoff und entweder keine oder nur kleine Mengen von Ameisensäure und Bernsteinsäure gefunden. Dieser Unterschied gegenüber den früheren Ergebnissen konnte mit dem Wachstumsstoffwechsel der Bakterien zusammenhängen. Deshalb wurde die frühere Arbeitsweise wieder aufgenommen.

### Versuche mit ruhenden Bakterien und Citrat.

Die Bakterien wurden auf Mineral-Nährböden folgender Zusammensetzung aerob bei 33° gezüchtet: 10—15 g Na-Citrat neutral, 1 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,5 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g KCl und Spuren von  $\text{FeCl}_3$ , in 1 Liter Wasser gelöst;  $p_{\text{H}} = 6,6$ . Die Bakterien wurden nach 20—40 Stunden zentrifugiert und mit physiologischer Kochsalz-Lösung gewaschen, noch 1-mal zentrifugiert und in Kochsalz-Lösung suspendiert. Durch diese Bakterien-Suspension wurde 4—5 Stunden Luft geleitet. Nachher wurden die Bakterien abzentrifugiert und in der Phosphat-Lösung des Versuches suspendiert. Auf diese Weise erhält man Bakterien, deren Eigengärung unbedeutend ist, wie z. B. folgender Versuch zeigt:

80 mg Bakterien (Trocken-Gew.), 16 Stunden bei 32° stehen gelassen, ergaben 0,05 Mmol  $\text{CO}_2$  und 0,05 Mmol flüchtige Säuren.

Mit derart behandelten Bakterien wurden die nachstehenden Versuche angestellt.

1. 2,9 Mmol Na-Citrat wurden in 110 ccm Wasser + 20 ccm  $\frac{m}{7,5}$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 20 ccm  $\frac{m}{7,5}$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  gelöst ( $p_{\text{H}} = 6,8$ ). Diese Lösung enthielt außerdem 150 mg Bakterien. Nach 20-stündigem Stehen im Brutschrank bei 32° fanden sich 3,85 Mmol  $\text{CO}_2$ , 5,4 Mmol Essigsäure, 1,03 Mmol Ameisensäure, 0,29 Mmol Bernsteinsäure.

Dies entspricht auf 1 Mmol Citronensäure 1,33 Mmol  $\text{CO}_2$ , 1,86 Mmol Essigsäure, 0,355 Mmol Ameisensäure und 0,1 Mmol Bernsteinsäure.

2. 3 Mmol Na-Citrat wurden in 50 ccm Wasser + 40 ccm  $\frac{m}{7,5}$ -Phosphatpuffer ( $p_{\text{H}} = 6,8$ ) gelöst. Bakterien 80 mg. Nach 20-stündigem Schütteln bei Raumtemperatur waren 0,18 Mmol  $\text{H}_2$ , 0,087 Mmol Alkohol, 2,25 Mmol  $\text{CO}_2$ , 3,48 Mmol Essigsäure, 0,47 Mmol Ameisensäure und 0,5 Mmol Bernsteinsäure entstanden. An Citronensäure wurden 0,93 Mmol wiedergefunden, es sind also 2,07 Mmol Citronensäure abgebaut.

Dies entspricht auf 1 Mmol Citronensäure 0,09 Mmol  $\text{H}_2$ , 0,043 Mmol Alkohol, 1,09 Mmol  $\text{CO}_2$ , 1,68 Mmol Essigsäure, 0,23 Mmol Ameisensäure und 0,24 Mmol Bernsteinsäure.

3. 3,1 Mmol K-Citrat wurden in 20 ccm Wasser + 80 ccm  $\frac{m}{7,5}$ -Phosphatpuffer ( $p_{\text{H}} = 6,8$ ) gelöst. Bakterien 80 mg. 17 Stunden bei 33°. Es wurden 3,7 Mmol  $\text{CO}_2$ , 5,5 Mmol Essigsäure, 0,92 Mmol Ameisensäure und 0,53 Mmol Bernsteinsäure gefunden.

Dies entspricht auf 1 Mmol Citronensäure 1,2 Mmol  $\text{CO}_2$ , 1,77 Mmol Essigsäure, 0,3 Mmol Ameisensäure und 0,17 Mmol Bernsteinsäure.

## Versuche mit Isocitronensäure.

Analoge Versuche ergaben, daß aus 3 Mmol *Isocitronensäure* (als K-Salz) 0,1—0,3 Mmol  $CO_2$ , 0,3—1,1 Mmol *Essigsäure*, 0,0—0,3 Mmol *Ameisensäure* entstehen, wobei der größte Teil der Isocitronensäure nicht abgebaut wird. Bei Versuchen mit K-Citrat, die parallel gingen, waren alle 3 Mmol abgebaut.

## Versuche mit Oxalessigsäure.

1. 3 Mmol oxalessigsäures Natrium wurden in 20 ccm Wasser + 80 ccm  $\frac{m}{1,5}$ -Phosphatpuffer ( $p_H = 6,8$ ) gelöst. Bakterien 100 mg. 12 Stunden bei 33°.

Gefunden: 3,9 Mmol  $CO_2$ , 1,4 Mmol *Essigsäure*, 1,03 Mmol *Ameisensäure*, 0,5 Mmol *Bernsteinsäure*.

Dies entspricht auf 1 Mmol *Oxalessigsäure* 1,3 Mmol  $CO_2$ , 0,343 Mmol *Ameisensäure*, 0,466 Mmol *Essigsäure* und 0,17 Mmol *Bernsteinsäure*. Parallel lief ein Versuch in Gegenwart von anorganischen N-Quellen.

2. 4 Mmol oxalessigsäures Na wurden in 30 ccm Wasser + 80 ccm Phosphatpuffer ( $p_H = 6,8$ ) gelöst, die 60 mg Bakterien enthielten. Es wurden noch 150 mg  $NH_4NO_3$ , 30 mg  $MgSO_4 + 7H_2O$ , in 20 ccm Leitungswasser gelöst, zugegeben. 14 Stunden bei 33°.

Gefunden: 7,2 Mmol  $CO_2$ , 0,16 Mmol *Ameisensäure*, 3,14 Mmol *Essigsäure* und 0,32 Mmol *Bernsteinsäure*.

Dies entspricht auf 1 Mmol *Oxalessigsäure* 1,8 Mmol  $CO_2$ , 0,04 Mmol *Ameisensäure*, 0,785 Mmol *Essigsäure* und 0,08 Mmol *Bernsteinsäure*.

Es wurden auch Versuche angestellt, bei denen gleichzeitig Wasserstoff und Alkohol bestimmt wurden.

3. 4 Mmol oxalessigsäures K wurden in 80 ccm Wasser + 50 ccm  $\frac{m}{5}$ -Phosphatpuffer ( $p_H = 6,8$ ) gelöst. Bakterien 90 mg.

Gefunden: 0,05 Mmol *Wasserstoff*, 0,14 Mmol *Alkohol*, 4,85 Mmol  $CO_2$ , 1,73 Mmol *Ameisensäure*, 2,4 Mmol *Essigsäure* und 0,92 Mmol *Bernsteinsäure*.

Dies entspricht auf 1 Mmol *Oxalessigsäure* 0,035 Mmol *Alkohol*, 1,21 Mmol  $CO_2$ , 0,43 Mmol *Ameisensäure*, 0,6 Mmol *Essigsäure* und 0,23 Mmol *Bernsteinsäure*.

4. 4 Mmol Oxalacetat, 200 mg  $NH_4NO_3$ , 30 mg  $MgSO_4 + 7H_2O$  in 80 ccm Leitungswasser + 50 ccm  $\frac{m}{5}$ -Phosphatpuffer ( $p_H = 6,8$ ) gelöst, die außerdem noch 35 mg Bakterien enthielten.

Gefunden: Kein *Wasserstoff*, 0,13 Mmol *Alkohol*, 5,66 Mmol  $CO_2$ , 1,88 Mmol *Ameisensäure*, 3,3 Mmol *Essigsäure* und 0,24 Mmol nicht reiner *Bernsteinsäure*.

Dies entspricht auf 1 Mmol *Oxalessigsäure* 0,033 Mmol *Alkohol*, 1,41 Mmol  $\text{CO}_2$ , 0,47 Mmol *Ameisensäure*, 0,825 Mmol *Essigsäure* und 0,06 Mmol *Bernsteinsäure*.

Wir erhalten im Gegensatz zu Wieland und Mitarbeitern<sup>1)</sup> aus *Oxalessigsäure* genau dieselbe Menge *Alkohol* wie aus *Citronensäure*. Die Bedingungen sind allerdings nicht die gleichen. Außerdem wurde früher (a. a. O.) aus *Citronensäure* und *Oxalessigsäure* auch *Wasserstoff* erhalten, der sicher aus einem Teil der *Ameisensäure* stammt. Diese Tatsache steht nicht im Gegensatz zu den neuen Versuchen. Hier sind die Bakterien *aerob* auf *Citrat* gezüchtet, früher dagegen *anaerob* auf *Hefewasser* und *Citrat* oder *Oxalacetat* oder auch auf *Hefewasser* allein. Es ist bekannt<sup>2)</sup>, daß nur an *Formiat* gewöhnte Bakterien die Fähigkeit zur Spaltung der *Ameisensäure* in  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  besitzen. Bei der anaeroben Züchtung auf *Hefewasser* kann eine solche Angewöhnung stattfinden, weil auch *Kohlenhydrate* anwesend sind, aber nicht bei der *aeroben* Züchtung auf *Citrat*. Aus diesem Grund haben wir bei Versuchen mit *anaerob* wachsenden Bakterien bei Zusatz von *Hefewasser* *Wasserstoff* gefunden<sup>3)</sup>, dagegen lassen sich bei Versuchen ohne *Hefewasser* nur Spuren davon nachweisen.

Daß der *Wasserstoff* aus der *Ameisensäure* stammt, geht daraus hervor, daß die genannten Autoren aus *Oxalessigsäure* entsprechend weniger *Ameisensäure* gefunden haben als ich. Ich finde auch weniger *Essigsäure*, was aber mit den *Bilanzen* besser übereinstimmt.

Meine Ergebnisse sind zusammengefaßt in der nachfolgenden Tabelle.

Aus dieser Tabelle sieht man, daß aus der *Citronensäure* und *Oxalessigsäure* mit ruhenden oder wachsenden Bakterien dieselben Produkte und in etwa denselben Mengen sich bilden. Nur an *Essigsäure* entsteht — wie zu erwarten ist — aus *Citronensäure* 1 Mol mehr als aus *Oxalessigsäure*. Da diese auch schneller abgebaut wird als die *Citronensäure*,

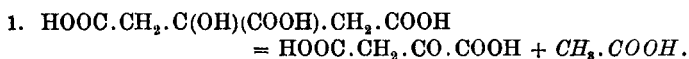
<sup>1)</sup> A. 525, 125 (1936).

<sup>2)</sup> M. Stephenson, Erg. d. Enzymf. 6, 139 (1937).

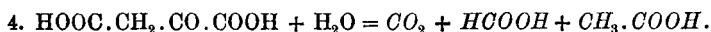
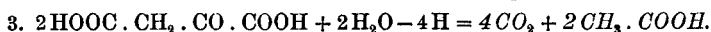
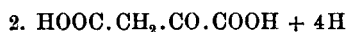
<sup>3)</sup> A. 525, 132 (1936).

	Alkohol	CO <sub>2</sub>	Ameisen- säure	Essig- säure	Bern- steins.
Mit <i>ruhenden Bakterien</i>					
1 Mol Citronensäure	0,043	1,1–1,35	0,23–0,38	1,68–1,86	0,10–0,24
1 Mol Oxalessigsäure	0,035	1,2–1,30	0,34–0,43	0,46–0,68	0,17–0,23
Mit <i>wachsend. Bakterien</i>					
1 Mol Citronensäure	0,06–0,20	1,8–2,0	0,00–0,27	1,60–1,75	0,00–0,10
1 Mol Oxalessigsäure	0,03	1,4–1,8	0,04–0,47	0,78–0,82	0,06–0,08

halte ich es für sehr wahrscheinlich, daß anaerob die Citronensäure über Essigsäure–Oxalessigsäure abgebaut wird. Während bei wachsenden Bakterien die Bilanzen stark von den Bedingungen abhängig sind, kann man bei ruhenden Bakterien genaue Bilanzen aufstellen. Aus diesen geht hervor, daß die Citronensäure nach dem folgenden Schema abgebaut wird:



Die Oxalessigsäure wird weiter nach folgenden Gleichungen abgebaut.



Also: auf 4 Mol *Citronensäure* entstehen 5 Mol CO<sub>2</sub>, 7 Mol CH<sub>3</sub>COOH, 1 Mol HCOOH und 1 Mol *Bernsteinsäure*.

Auf 1 Mol Citronensäure:	CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> ·COOH	HCOOH	Bernstein- säure
Ber. . . .	1,25	1,75	0,25	0,25
Gef. . . .	1,1–1,3	1,68–1,86	0,23–0,38	0,1–0,24

Daß bei einigen Versuchen etwas mehr *Ameisensäure* entsteht, kann man durch deren Bildung aus Brenztraubensäure erklären. Außerdem entstehen noch 0,04 Mol *Alkohol* und Spuren von *Acetaldehyd*.

Der Verfasser dankt der Universität Athen für das ihm gewährte Stipendium aus der Voltos-Stiftung.