

Einwirkung von Invertin auf die Bariumsalze der
 α - und β -Methyl-fructosid-diphosphorsäuren.

148,1 mg Bariumsalz (α)_D = + 8,5°, 3 ccm Acetatpuffer, 0,08 ccm Invertinlösung wurden zu 25 ccm gelöst und bei 30° aufbewahrt. Je 10 ccm wurden titriert.

Stunden	mg Cu
1	0,66
17	0,66

159,0 mg Bariumsalz (α)_D = — 8,7°, 3 ccm Acetatpuffer, 0,08 ccm Invertinlösung wurden zu 25 ccm gelöst und bei 30° aufbewahrt. Je 10 ccm wurden titriert.

Stunden	mg Cu
1	0,66
17	0,60

[Mitteilungen aus dem Chemischen Laboratorium der Bayer.
 Akademie der Wissenschaften zu München.]

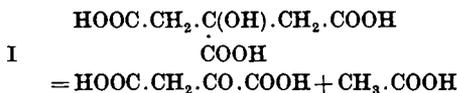
(Eingelaufen am 4. August 1939.)

Der Abbau der Citronensäure durch Bakterien;

von Michael Deffner und Wilhelm Franke.

Mit 4 Figuren im Text.

In einer vorausgehenden Mitteilung¹⁾ hat M. Deffner — im Anschluß an eine wohl zuerst von Wieland und Sonderhoff²⁾ geäußerte Vermutung — ein Schema für die bakterielle Vergärung der Citronensäure entwickelt, an dessen Spitze der anaerobe Zerfall des Citronensäure-moleküls in Oxalessigsäure + Essigsäure steht:



¹⁾ A. 536, 44 (1938).

²⁾ A. 503, 61 (1933); Erg. Enzymforschg 3, 163 (1934).

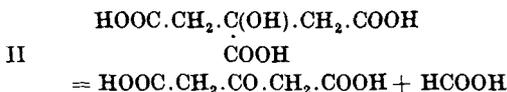
Zahlreiche Bilanzen der erhaltenen Gärungsprodukte ergaben, daß der weitere Reaktionsverlauf am besten im Sinne der 3 Gleichungen



zu beschreiben ist, entsprechend der Tatsache, daß aus 4 Molekülen Citronensäure sehr angenähert 7 Moleküle Essigsäure (Gleichung I ist für diese Bilanz mit dem Index 4 zu versehen), 5 Moleküle CO_2 , 1 Molekül HCOOH und 1 Molekül Bernsteinsäure entstehen.

Diese Befunde, die an einem aus Münchner Löwenbräuhefe isolierten, zunächst nicht näher bestimmten Bakterium erhalten worden waren, standen nun im Widerspruch einerseits zu den älteren Angaben von Butterworth und Walker¹⁾ über den Citratabbau durch *B. pyocyaneum* (1.), andererseits zu der neueren von Martius²⁾ für den Citronensäureumsatz in tierischem Gewebe entwickelten und experimentell belegten Theorie (2.).

1. Nach Walker und Mitarbeitern ist das Primärprodukt des Citratabbaus durch das genannte Bakterium (wie auch durch den Schimmelpilz *Aspergillus niger*³⁾) Acetondicarbonsäure, die vermutlich nach



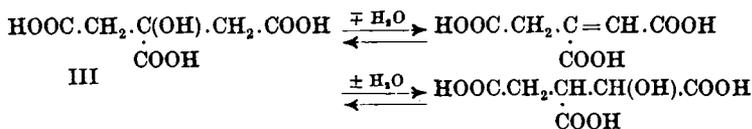
gebildet wird und weiterhin — hauptsächlich wohl über Malonsäure — zu Essigsäure, teilweise auch zu Bernsteinsäure abgebaut wird. Nach Butterworth und Walker sollen sich zu geeigneten Zeitpunkten des Gärungsablaufs Acetondicarbonsäure (als Aceton) in einer Ausbeute bis zu 67%, Malonsäure in einer solchen von 52% der eingesetzten Citronensäure fassen lassen.

¹⁾ Biochem. J. **23**, 926 (1929).

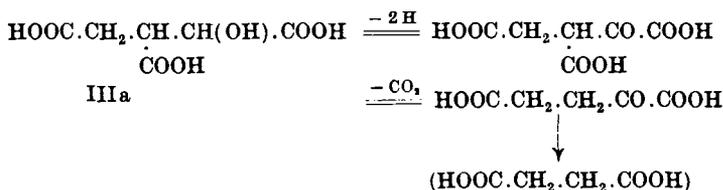
²⁾ H. **247**, 104 (1937).

³⁾ F. Challenger, Subramaniam u. Walker, Soc. **1927**, 200, 3044.

2. Martius hat für den tierischen Organismus die primäre Umlagerung der Citronensäure (über Aconitsäure) in *Iso-citronensäure*



und deren Abbau über Oxalbernsteinsäure zu α -Ketoglutarensäure (und eventuell weiterhin zu *Bernsteinsäure*)



bewiesen. Er glaubt neuerdings¹⁾, gestützt auf das in einigen Bakterien (*B. coli*, *B. prodigiosum*, *B. pyocyaneum*) nachgewiesene Vorkommen des Reaktion III katalysierenden Enzyms *Aconitase*, daß die Abbaufolge bis zur α -Ketoglutarensäure auch für *Mikroorganismen* obligat sei; Reduktion zu α -Oxyglutarensäure, Umlagerung der letzteren in β -Oxyglutarensäure (analog Reaktion III) und anschließende Dehydrierung zu *Acetondicarbonensäure* (β -Ketoglutarensäure) würden die Voraussetzung sowohl für die Entstehung von *Aceton* als auch von *Essigsäure* schaffen, ganz abgesehen von der zwanglosen Erklärung der *Bernsteinsäure*-bildung (im Sinne von Gleichung IIIa).

Hauptzweck der vorliegenden Untersuchung war es, die hier zweifellos noch bestehenden Widersprüche und Unklarheiten zu beseitigen, wozu vor allem eine Nacharbeitung der von Butterworth und Walker an *B. pyocyaneum* erhobenen Befunde notwendig war. Das Gewicht der Martiusschen Einwände und Formulierungen war an Hand der Bilanzen zu prüfen, wobei zu berücksichtigen war, daß das Deffnersche Schema hinsichtlich der Oxydoreduktionsbilanz ausgeglichen ist, während dasjenige von Martius zum wenigsten *eine* über-

¹⁾ H. 257, 29 (1938).

zählige Dehydrierungsphase enthält; in diesem Zusammenhang war weiter zu untersuchen, ob unser Schema auch dem *aeroben* Citratabbau durch Bakterien gerecht zu werden vermag. Schließlich waren noch einige Fragen mehr *bakteriologischer* Art zu klären; dazu gehörte die Identifizierung des bisher verwendeten Bakteriums aus Brauereihefe, sowie die Beseitigung einer Diskrepanz zwischen Stoffwechsel- und Dehydrierungsversuch, auf die zuerst Franke und Peris¹⁾ hingewiesen haben: die Citronensäure, die nach übereinstimmenden Literaturangaben der überwiegenden Mehrzahl der Bakterien als ausgezeichnetes *Baumaterial* zu dienen imstande ist, zeigt in *aeroben* Dehydrierungsversuchen mit *ruhenden* Bakterien — von wenigen Ausnahmen abgesehen — eine erstaunliche Resistenz.

I. Identifizierung des aus „verarmter“ Hefe isolierbaren citratvergärenden Bakteriums.

Die Isolierung dieses Bakteriums, mit dem erstmalig Wieland und Sonderhoff²⁾, sowie Sonderhoff und Deffner³⁾ über den anaeroben Abbau der Citronensäure und etwas später Wieland, Crawford und Walch⁴⁾ über die Vergärung der Fumar-, Äpfel- und Oxalessigsäure gearbeitet hatten, geschah nach den in den beiden letztgenannten Arbeiten enthaltenen Angaben. Morphologische und chemische Identifizierungsversuche ergaben eindeutig, daß der Mikroorganismus in die *Aerogenes*-gruppe (in der angelsächsischen, holländischen und dänischen Literatur meist als *Aerobacter* bezeichnet) gehört und als *Bact. lactis aerogenes* bzw. *Aerobacter aerogenes* zu klassifizieren ist⁵⁾.

Das Vorkommen von *Milchsäurebakterien* in Hefe ist übrigens bekannt⁶⁾. Bei den folgenden Bestimmungsversuchen dienten uns

¹⁾ Bio. Z. 295, 61 (1937).

²⁾ A. 503, 61 (1933); 520, 150 (1935).

³⁾ A. 525, 132 (1936).

⁴⁾ A. 525, 119 (1936).

⁵⁾ Zur Nomenklaturfrage vgl. z. B. R. E. Buchanan, *General systematic bacteriology*, S. 169 (Baltimore 1925).

⁶⁾ Vgl. z. B. A. Janke u. H. Zikes, *Arbeitsmethoden der Mikrobiologie*, S. 142 (Dresden u. Leipzig 1928).

verschiedene Stämme von *B. lactis aerogenes* wie auch *B. acidi lactici* [das mit ersterem sehr nahe verwandt, wenn nicht identisch ist¹⁾] zum Vergleich²⁾. Bei der Prüfung auf eine bestimmte Eigenschaft wurden stets auch andere Bakterien-spezies [z. B. *B. coli*, *B. prodigiosum*, *B. pyocyaneum*, *B. vulgare* (*Proteus*)] von bestimmt abweichendem Verhalten zur Kontrolle herangezogen.

Zur Charakterisierung der aus Münchener Löwenbräuhefe isolierbaren *Aerogenes*-Stämme (im folgenden der Einfachheit halber des öfteren als „Hefe-Bakterium“ oder „Hefe-*Aerogenes*“ bezeichnet) mögen folgende Angaben dienen:

Es handelt sich um 0,9—1,7 μ lange und 0,4—0,7 μ breite *gram-negative* Stäbchen; je jünger die Kultur, um so kürzer und gedrungener ist im allgemeinen der Habitus, um so größer ist auch, wie schon Wieland u. Mitarbeiter (a. a. O.) feststellten, die Fähigkeit zum anaeroben Substratabbau. *Sporenbildung* und *Eigenbewegung* sind nicht beobachtet worden. Das Wachstum erfolgt *aerob* wie *anaerob*, auf den üblichen festen Nährböden in Form saftig glänzender Auflagen. *Gelatine* wird nicht verflüssigt, hingegen *Milch* im Verlauf eines bis mehrerer Tage — je nach Stamm und Alter der Kultur — unter Säuerung koaguliert. Sowohl aus Glucose- wie aus Lactosebouillon wird im Gärröhrchen *Gas* entwickelt, das im ersteren Falle aus etwa gleichen Teilen H_2 und CO_2 , im letzteren aus mehr H_2 als CO_2 besteht. In Bouillon-kultur erfolgt deutliche *H₂S-Bildung*, Bebrütung in der Zimpfelsen Tryptophan-Lactatnährlösung gibt stark positive *Indol*-reaktionen (und zwar sowohl nach Ehrlich-Frieber wie nach Legal-Weyl und Kitasato-Salkowski³⁾). Zur Differentialdiagnose, insbesondere gegenüber der *Coli*-gruppe, eignen sich der Voges-Proskauer-, der *Methylrot*- und der *Citrat-test*⁴⁾. Namentlich der stark *positive* Ausfall des ersteren — im Prinzip eine Reaktion auf *Acetoin*, die nach der verbesserten Methode von Werkman⁵⁾ ausgeführt wurde — ist äußerst charakteristisch für die Vertreter der Gattung *Aerogenes*. Dazu paßt, daß auf Glucose-Pepton-Phosphat [nach Koser⁴⁾]

¹⁾ Näheres bei K. B. Lehmann u. R. O. Neumann, Bakteriologische Diagnostik, Bd. II, S. 356 (München 1927).

²⁾ Die Stämme waren u. a. vom Hygienischen Institut der hiesigen Universität, von den milchwirtschaftlichen Forschungsinstituten in Weihenstephan und Kiel, von der ehem. Krälschen Sammlung in Wien und vom College of agriculture in Berkeley (Cal.) bezogen. Den Herren Professoren Demeter (Weihenstephan), Hettche (München) und Barker (Berkeley) sind wir für die kostenlose Überlassung von *Aerogenes*-kulturen zu großem Dank verpflichtet.

³⁾ Zur Methodik vgl. M. Klimmer, Technik und Methodik der Bakteriologie und Serologie, S. 267 (Berlin 1923).

⁴⁾ S. A. Koser, J. Bacteriol. 9, 59 (1924).

⁵⁾ C. H. Werkman, J. Bacteriol. 20, 121 (1930).

keine mit Methylrot nachweisbare Säuerung erfolgte und daß das Wachstum auf Mineralsalzlösungen, die Citrat als einzige C-Quelle enthielten, stets ausgezeichnet war¹).

II. Der Einfluß der „Gewöhnung“ auf den Citratabbau durch Bakterien.

In der schon zitierten Arbeit von Franke und Peris war in 3-stündigen aeroben Versuchen mit ruhenden Bakterien, die durchweg auf Bouillon-Agar gezüchtet worden waren, auch in einigen solchen Fällen kein Angriff der Citronensäure festzustellen gewesen, wo deren Verwertung als C-Quelle des Wachstums aus älteren Untersuchungen²) mit Sicherheit bekannt, ihr Abbau teilweise sogar präparativ untersucht worden war (z. B. bei *B. lactis aerogenes*³) bzw. *acidi lactici* und *B. pyo-*

¹) Hingegen wuchs unser Hefe-bakterium im Gegensatz zu verschiedenen anderen geprüften *Lactis aerogenes*- bzw. *Acidi lactici*-Stämmen ziemlich schlecht auf Weinsäure, ein Befund, dem indes nach Koser [J. Bacteriol. 8, 493 (1923)], der ein recht unterschiedliches Verhalten der genannten Bakteriengruppe gegenüber Tartrat festgestellt hat, keine diagnostische Bedeutung zukommt. Auf diesen Punkt wird hier nur deshalb hingewiesen, weil C. B. van Niel in einem Übersichtsreferat [Ann. Rev. Biochem. 6, 609 (1937)] den von Wieland und seiner Schule verwendeten Mikroorganismus für identisch hält mit einem von Barker [Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam, Proc. 39, Nr. 5 (1936)] aus Gartenerde durch Kultur auf Tartratlösung reingezüchteten Bakterium, das gleichfalls hervorragendes Vermögen zur Vergärung von C₄-Dicarbonsäuren besitzt. Ein derartiger Organismus war früher schon von Nijdam als *Aerobacter tartarivorum* beschrieben worden, Barker hält diese Spezialisierung jedoch für unnötig und rubriziert seinen Organismus schlechthin als *Aerobacter aerogenes*. Die Prüfung einer uns von Prof. Barker in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellten Reinkultur ergab, daß sein *Aerogenes*-stamm sich gegenüber Citronensäure und Weinsäure genau umgekehrt verhält wie unser Hefe-*Aerogenes*: er wächst nämlich ausgezeichnet auf Tartrat, aber ziemlich dürftig auf Citrat, ein weiterer Beleg für die recht erheblichen Variationen im Bereich der *Aerogenes*-gruppe, der zugleich die Grenzen einer des öfteren vorgeschlagenen, rein chemischen Diagnostik der Mikroorganismen (vgl. z. B. W. Franke u. Peris, a. a. O., S. 88) aufzeigt. Ein Hauptgrund derartiger Stammesunterschiede liegt zweifellos in *Gewöhnungserscheinungen*, wofür im folgenden Abschnitt noch experimentelle Belege gebracht werden sollen.

²) Vgl. z. B. A. Maassen, Arb. kais. Gesundheitsamt 12, 340 (1896).

³) A. W. Bosworth u. Prucha, J. biol. Chem. 8, 479 (1911); H. C. Brown, Duncan u. Henry, J. Hygiene 23, 1 (1924).

*cyaneum*¹⁾). Es war seinerzeit — unter Hinweis auf die damals allein bekannten Schemata II und III (S. 86/87) — angenommen worden, „daß eine nichtdehydrierende Vorbereitungsreaktion dieser Art in Bakterien im allgemeinen langsam erfolgt, was bei den vielstündigen Stoffwechselversuchen keine erhebliche Rolle spielt, wohl aber bei den relativ kurzdauernden Dehydrierungsversuchen“. Wir sind heute der Auffassung, daß diese Primärreaktion, sowohl unter anaeroben wie aeroben Bedingungen, bei Bakterien allgemein durch Gleichung I dargestellt wird, und daß sie durch ein *adaptives* Enzym im Sinne Karströms²⁾ (d. h. ein Enzym, das sich — im Gegensatz zu den *konstitutiven* — in den Zellen erst unter dem Einfluß der *Gewöhnung* an das Substrat, hier Citronensäure, bildet) katalysiert wird.

Experimentelle Belege für die Richtigkeit dieser Auffassung ließen sich am Beispiel des *Citratabbaus* sowohl bei *B. lactis aerogenes* und *B. acidi lactici* wie auch bei *B. pyocyaneum* erbringen. Am erstgenannten Organismus konnte ferner gezeigt werden, daß die Verhältnisse für den Angriff des *Tartrats* (den Franke und Peris unter ihren Bedingungen bei keinem einzigen von 20 untersuchten Bakterien eindeutig hatten nachweisen können) ganz analog liegen.

Die zu diesen Versuchen verwendeten Bakterien wurden auf 2 bzw. 3 verschiedenen Nährböden gezüchtet:

1. auf einem „natürlichen“, *Hefewasser*, das durch Auskochen von Preßhefe mit der 10fachen Wassermenge, Filtrieren und Sterilisieren gewonnen worden war;

2. auf einem „künstlichen“ *Mineralsalznährboden*, der im Liter 1,5 g NH_4NO_3 , 1,5 g KH_2PO_4 , 0,1 g KCl, 0,3 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und Spuren von FeCl_3 enthielt; als C-Quelle erhielt

2a) 10 g kristallisiertes *Na₃-Citrat*,

2b) 10 g kristallisiertes *Na₂-Tartrat*.

Die Bebrütung erfolgte in sterilen Erlenmeyer-kolben 20—24 Stunden lang bei 37°. Die Herstellung einer Suspension von ruhenden, verarmten Bakterien bekannten Trockengewichts geschah in der üblichen, u. a. in den öfters zitierten Arbeiten von M. Deffner und W. Franke u. Peris eingehend geschilderten Weise. (Bei manchen Stämmen ließen sich die Organismen infolge ihrer zäh-schleimigen Beschaffenheit kaum aus der

¹⁾ J. Butterworth u. Walker, a. a. O., S. 86.

²⁾ H. Karström, Erg. Enzymföschg 7, 350 (1938).

Nährlösung abzentrifugieren. In solchen Fällen wurden feste Nährböden verwendet, die durch Zusatz von 3 Proc. Agar zu den Nährlösungen erhalten worden waren.)

Das Vermögen der Organismen zum Abbau von Citronen- bzw. Weinsäure wurde bei 37° in aeroben Versuchen nach der Barcroft-Warburg-Methodik festgestellt (Gasraum stets Luft). Der allgemeine Ansatz war:

- 2 ccm Bakterien-suspension (7—10 mg Trockengewicht),
- 1 ccm $m/_{7,5}$ -Phosphatpuffer (p_{H7}),
- 2 ccm physiologische NaCl-Lösung bzw. $m/_{100}$ -Substratlösung.

Ansätze mit Na-Acetat oder Na₂-Succinat als Substrat liefen stets nebenher, um die annähernd gleiche Aktivität der auf verschiedenen Nährböden gewachsenen Bakterien gegenüber diesen offensichtlich durch konstitutive Dehydrorasen angegriffenen Substraten darzutun.

Das Ergebnis eines Versuchs, in dem *B. lactis aerogenes* (Weihenstephan), das parallel auf Hefewasser, Citrat- und Tartratnährlösung gezüchtet worden war, auf sein aerobes

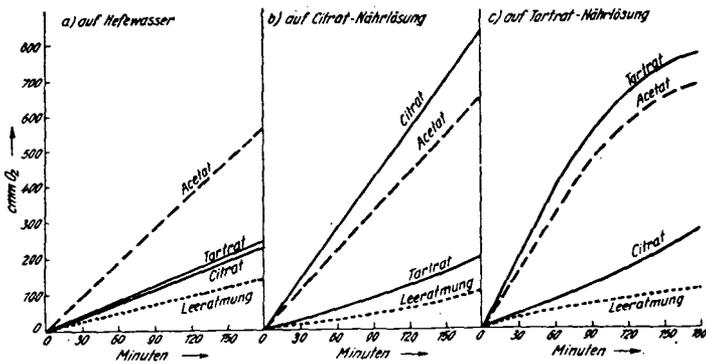


Fig. 1.

B. lactis aerogenes, auf verschiedenen Nährböden gezüchtet.

Dehydrierungsvermögen gegenüber *Essigsäure*, *Citronensäure* und *Weinsäure* geprüft wurde, zeigt Fig. 1. Eindeutig erkennt man in b) und c) die außerordentlich gesteigerte Oxydationsgeschwindigkeit desjenigen Substrats, an das sich der Organismus während der Züchtung hatte gewöhnen können.

Im übrigen bestehen innerhalb der *Aerogenes*-gruppe, wie orientierende Barcroft-Versuche mit auf Kollektivnährböden (wie Hefewasser,

Nährbouillon) gewachsenen Organismen zeigten, alle Abstufungen hinsichtlich des Citrat- und Tartratangriffs, vom fast völligen Unvermögen bis zu recht ausgesprochener Abbaufähigkeit (vgl. auch Fußnote S. 90). Der seinerzeit von Franke u. Peris verwendete *Acidi lactici*-Stamm war in dieser Beziehung einer der reaktionsträgsten.

Über die für die Gewöhnung notwendige Zeitspanne läßt sich a priori nichts Bestimmtes aussagen. Während sich in Fig. 1a innerhalb der Versuchsdauer von 3 Stunden keinerlei Hinweis auf beginnende Adaptation, in 1b und 1c bei Tartrat bzw. Citrat nur leichte Andeutungen einer solchen erkennen lassen, trat der Gewöhnungseffekt bei anderen Stämmen in

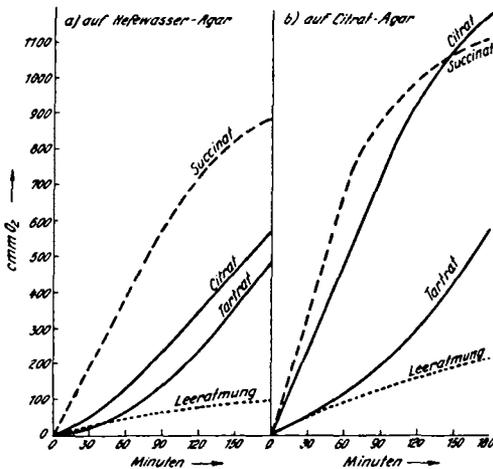


Fig. 2.

B. acidilactici, auf verschiedenen Nährböden gezüchtet.

der gleichen Zeit schon in recht betonter Weise auf, wie dies in Fig. 2 für einen Stamm von *B. acidilactici* (Kiel) gezeigt wird.

Der autokatalytische Verlauf des Citrat- und Tartratabbaus in Fig. 2a, des Tartratabbaus in Fig. 2b kann wohl kaum andersedeutet werden, als daß die betreffenden Substrate als *Reiz auf die Einzelzelle* wirken, die mit vermehrter Enzyymbildung, bzw. Freilegung des Enzyms aus einer inaktiven Vorstufe [nach Yudkin¹⁾] darauf reagiert. Denn die

¹⁾ Biol. Rev. 18, 93 (1938).

Kürze der Versuchsdauer und die Tatsache, daß es sich um *ruhende*, d. h. mangels einer N-Quelle sich nicht teilende Bakterien handelt, schließt die beiden anderen Erklärungsmöglichkeiten aus, nämlich daß die Substrate als *Bausteine* bei der Synthese der Enzymmoleküle oder aber als *auswählende Agentien* während der Vermehrung der Zellen, in denen das entsprechende Enzym als Mutation aufgetreten ist, wirken¹⁾.

Auch bei unseren *Hefe-Aerogenes*-stämmen, sowie bei *B. pyocyaneum* treten die Erscheinungen der Gewöhnung an Citronensäure qualitativ in der gleichen Weise auf, wie aus der folgenden Tabelle — die Züchtungs- und Versuchsbedingungen waren die gleichen wie oben schon beschrieben — eindeutig hervorgeht.

Tabelle 1.

Zeit (Min.)	<i>B. lactis aerogenes</i> , gezüchtet auf						<i>B. pyocyaneum</i> ²⁾ , gezüchtet auf					
	a) Hefewasser			b) Citratlösung			a) Hefewasser			b) Citratlösung		
	Leer- O ₂ atmg.	Succi- nat	Ci- trat	Leer- atmg.	Succi- nat	Ci- trat	Leer- atmg.	Ace- tat	Ci- trat	Leer- atmg.	Ace- tat	Ci- trat
60'	55	310	120	65	350	395	90	520	150	70	820	1140
120'	120	650	300	130	720	620	160	1250	285	135	1460	2170
180'	180	940	470	200	960	800	230	1560	470	190	1730	2520

III. Der anaerobe Citratabbau durch *B. pyocyaneum*.

Die Untersuchung dieses Organismus war für uns insofern von besonderem Interesse, als für ihn als einziges Bakterium die intermediäre Bildung von *Acetondicarbonsäure* bzw. *Aceton* beim Citratabbau (von Butterworth und Walker) angegeben war und experimentell belegt schien. Andere Autoren hatten bei der Citratvergärung durch andere Bakterien, soweit sie auf diese Stoffe prüften, deren Anwesenheit stets vermißt, so H. C. Brown, Duncan und Henry (a. a. O., S. 90) bei *B. suipestifer*, W. F. Bruce³⁾ bei dem nahe verwandten *B. aerrycke* und Wieland und Sonderhoff, sowie Deffner bei *B. lactis aerogenes* (aus Hefe).

¹⁾ Vgl. Anmerkung S. 93.

²⁾ In den Versuchen mit *B. pyocyaneum* war die Substratkonzentration doppelt so hoch wie in dem S. 92 angegebenen Ansatz.

³⁾ J. biol. Chem. 107, 119 (1934).

Wir haben zunächst die Versuche von Butterworth und Walker mit *wachsenden* Bakterien an zwei verschiedenen Stämmen von *B. pyocyaneum*¹⁾ nachgearbeitet.

Die Organismen wurden entweder bei 32° oder bei 37° in einer Nährlösung gezüchtet, die auf 1 Liter Leitungswasser 20 g krystallisiertes Diammonium-citrat, 6 g NaCl, 2,5 g KH₂PO₄ und Spuren von FeCl₃ enthielt. Nachdem durch NH₃-Zusatz das p_H der Lösung auf 7 eingestellt war, wurden je 200 ccm derselben in 300-ccm-Erlenmeyerkolben sterilisiert, mit einer Öse einer frischen Agarkultur beimpft und bestimmte, aber verschiedene Zeiten im Brutschrank gehalten. Dann wurde je ein Versuch abgebrochen, nach p_H-Kontrolle von den Bakterien abzentrifugiert, angesäuert und die Hälfte des Flüssigkeitsvolumens abdestilliert. Vom Destillat wurde wieder die Hälfte abdestilliert und dieses Verfahren noch einmal wiederholt, so daß schließlich ein Flüssigkeitsvolumen von 20—30 ccm resultierte, das mit 2,4-Dinitrophenyl-hydrazin in 2 n-salzsaurer Lösung versetzt wurde.

Die folgende Tab. 2 enthält eine Zusammenstellung der von uns ausgeführten Versuche zusammen mit einem von Butterworth und Walker angegebenen Versuch, in dem die Menge der zu bestimmten Zeiten gefundenen „Acetonkörper“ in Proc. der eingesetzten Citronensäure ausgedrückt sind.

Tabelle 2.

Stämme (Temp.)	Stunden Versuchsdauer (in Klammern End-p _H)								
Stamm 1 (37°)	40 (7,3)		64 (7,6)		112 (8,4)				
Stamm 2 (32°)	40 (7,9)		64 (8,3)		72 (8,6)				
Stamm 2 (37°)	34 (7,6)	41 (7,7)	47 (7,8)	54 (7,9)	63 (8,0)	120 (8,3)			
Stamm v. Butterworth u. Walker (34°)	27	32	40	44	48	55	60	64	72
% Aceton	0,04	0,115	0,20	14,5	16,5	67,0	66,2	0,39	0,115

Das überraschende, aber übereinstimmende Ergebnis aller unserer Versuche war, daß sich *in keinem Falle* mit Sicherheit Aceton nachweisen ließ, obwohl in Kontrollversuchen, in denen kleine Mengen Acetondicarbonsäure (z. B. 10 mg, entsprechend 4 mg Aceton) der oben geschilderten Destillation unterworfen

¹⁾ Einige *Pyocyaneum*-Stämme verdanken wir dem Entgegenkommen von Herrn Dozenten Dr. habil. G. Endres (Chem. Inst. d. Univ. Hamburg).

wurden, einwandfreie Hydrazonfällungen erhalten wurden. Wir können über die Ursache der Diskrepanz zwischen den Angaben der englischen Autoren und unseren eigenen im Augenblick nichts Bestimmtes aussagen; wir glauben nicht, daß es sich um ein grundsätzlich verschiedenes chemisches Verhalten der verwendeten *Pyocyaneum*-Stämme handelt, wir neigen vielmehr zu der Annahme, daß den englischen Forschern vielleicht irgendein — nachträglich schwer feststellbarer — methodischer Fehler unterlaufen ist.

Es ist hinsichtlich der quantitativen Verhältnisse zu berücksichtigen, daß jeder unserer Versuchsansätze 3,2 g wasserfreie Citronensäure enthielt; ein selbst nur 1-proc. Umsatz zu Acetondicarbonsäure — rund 10 mg Aceton entsprechend — hätte uns unmöglich entgehen können. Wir erhielten zwar bisweilen im Enddestillat Trübungen und minimale, kaum wägbare oder zu einer Schmelzpunktsbestimmung ausreichende Niederschläge, und zwar besonders dann, wenn wir versuchsweise die Bakterien vor dem Ansäuern und Destillieren nicht durch Zentrifugieren entfernten. (In der Arbeit von Butterworth und Walker findet sich kein Hinweis darauf, daß die Ansätze vor der Aufarbeitung zentrifugiert worden wären; offenbar wurden sie direkt nach dem Ansäuern unter Rückfluß $\frac{1}{4}$ Stunde gekocht und anschließend etwa zur Hälfte in eine mit Denigès-Reagens gefüllte Vorlage destilliert.) Jedenfalls konnten diese Trübungen und minimalen Fällungen ebenso gut wie auf Aceton auf *Acetaldehyd* zurückzuführen sein, dessen spurenweise Entstehung (neben etwas größeren Mengen Alkohol) schon von Wieland und Sonderhoff und später von Deffner bei der Citratvergärung durch Hefeaerogenes nachgewiesen worden war.

Die von uns nachgeahmten Versuchsbedingungen von Butterworth u. Walker sind nun insofern nicht einwandfrei, als 1. die Ansätze nicht streng anaerob gehalten werden, durch gelegentliches Umschütteln sogar mit neuem Luftsauerstoff in Berührung kommen; 2. die Nährlösungen bei längerer Versuchsdauer so alkalisch werden (vgl. Tab. 2), daß *B. pyocyaneum* — das nach Dornby¹⁾ optimal bei pH 6,8, maximal bei pH 8,0 wächst — sein Wachstum einstellt und vermutlich geschädigt wird. Dazu

¹⁾ Ann. Inst. Pasteur 35, 277 (1921).

kommt 3. der Einwand, der sich allgemein gegen die Methode des „Verwendungsstoffwechsels“ erheben läßt, daß nämlich irgendwelche faßbaren Abbauprodukte nicht *direkt* aus der zugesetzten C-Quelle, sondern *indirekt* aus primär daraus aufgebauten Zellsubstanzen (z. B. Aminosäuren) entstanden sein können.

Um bei den folgenden Bilanzversuchen, in denen eine quantitative Ermittlung der bei der Citratvergärung durch *B. pyocyaneum* tatsächlich entstehenden Produkte geplant war, eindeutige Verhältnisse zu haben, wurde wiederum, wie schon in der ersten Arbeit von Deffner, mit *ruhenden Bakterien* und *im Vakuum* bei 37° gearbeitet.

Die Züchtung der hierbei zur Verwendung gelangenden Organismen geschah in einer stärker gepufferten Nährlösung, die im Liter 15 g kristallisiertes Na₂-Citrat, 2 g NH₄NO₃, 4 g KH₂PO₄, 0,2 g MgSO₄·7H₂O, 0,1 g KCl nebst einer Spur FeCl₃ enthielt. Bisweilen wurde unter Durchleiten von Stickstoff streng anaerob gezüchtet; doch stieg auch ohne diese Maßnahme das p_H der Nährlösung nur mäßig, beispielsweise in 34 Stunden bei 37° von 6,6 auf 7,4. Einen wesentlichen Unterschied im Verhalten der mit und ohne Stickstoff-durchleitung gezüchteten Bakterien haben wir nie bemerkt.

Nachstehend teilen wir tabellarisch das Resultat dreier mit zwei verschiedenen *Pyocyaneum*-Stämmen ausgeführter *Citronensäure*-versuche, sowie eines *Oxalessigsäure*-versuches mit. Bezüglich methodischer Einzelheiten sei auf die früher zitierten Veröffentlichungen von Wieland und Sonderhoff und von Deffner verwiesen. In Anlehnung an das Verfahren der Kluysverschen Schule¹⁾ geben wir in den Tabellen außer den *Umsätzen* (in Mmol) auch *C- und H-Bilanzen* (in Proc.) wieder. Sie vermitteln ein zuverlässiges Bild davon, bis zu welchem Umfang das verschwundene Substrat in den Produkten wiedergefunden wird und stellen in ihrer Kombination ein sicheres Kriterium für streng anaerobe Versuchsführung dar.

Zwei *Zahlenbeispiele* mögen die Art ihrer Berechnung veranschaulichen. 1. Bei einem Versuch werden pro Mmol verschwundener Citronensäure 1,8 Mmol Essigsäure gefunden; diese repräsentieren dann $1,8 \cdot 2/6 \cdot 100 = 60$ Proc. des ursprünglichen Citronensäure-kohlenstoffs, da Essigsäure 2, Citronensäure 6 C-Atome im Molekül enthält. 2. Unter „H-Kapazität“ einer organischen Verbindung werde diejenige Zahl von H-Atomen

¹⁾ Vgl. z. B. A. J. Kluysver, The chemical activities of microorganisms (London 1931); ferner H. A. Barker, a. a. O., Fußnote S. 90.

verstanden, die frei werden, wenn der gesamte C des Moleküls — allenfalls unter Zuhilfenahme von H_2O — in CO_2 übergeführt wird. Sie ist z. B. für $HCOOH = 2$, für $CH_3COOH = 8$ (nach $CH_3 \cdot COOH + 2H_2O = 2CO_2 + 8H$), für Oxalessigsäure = 10, für Bernsteinsäure = 14, für Citronensäure = 18. Die 1,8 Mmol Essigsäure des Beispiels 1 stellen demgemäß $1,8 \cdot 8 / 18 \cdot 100 = 80$ Proc. der „H-Kapazität“ der abgebauten Citronensäure — in den Tabellen einfach als Proc. H bezeichnet — dar.

Tabelle 3.

Ansatz: 3 Mmol Na_3 -Citrat in 250 ccm $m_{/12,5}$ -Phosphatpuffer (pH 6,6); 45 mg (Trockengewicht) Bakterien, anaerob gezüchtet (Stamm 1 München). Versuchsdauer: 80 Stunden.

	Umsatz in Mmol	Umsatz in Mmol pro Mmol Citrat	% C	% H
<i>Verschwunden:</i>				
Citronensäure	3	1	100	100
<i>Erhalten:</i>				
CO_2	4,5	1,5	25	0
$HCOOH$	1,0	0,33	5,5	3,7
$CH_3 \cdot COOH$	5,2	1,73	57,8	77,1
$(CH_2 \cdot COOH)_2$	0,51	0,17	11,3	13,2
			total: 99,6	94,0
			$\frac{\% H}{\% C} = 0,94$	

Tabelle 4.

Ansatz: 3 Mmol Na_3 -Citrat in 250 ccm $m_{/20}$ -Phosphatpuffer (pH 7,1); 150 mg Bakterien, anaerob gezüchtet (Stamm 1 München). Versuchsdauer: 22 Stunden.

	Umsatz in Mmol	Umsatz in Mmol pro Mmol Citrat	% C	% H
<i>Verschwunden:</i>				
Citronensäure	2,5	1	100	100
<i>Erhalten:</i>				
CO_2	3,1	1,24	20,7	0
$HCOOH$	1,0	0,4	6,7	4,5
$CH_3 \cdot COOH$	4,0	1,6	53,4	71,2
$(CH_2 \cdot COOH)_2$	0,38	0,15	10,0	11,7
			total: 90,8	87,4
			$\frac{\% H}{\% C} = 0,96$	

Tabelle 5.

Ansatz: 3,1 Mmol Na_3 -Citrat in 250 ccm $m/_{15}$ -Phosphatpuffer (pH = 6,8); 140 mg Bakterien, normal (ohne N_2) gezüchtet (Stamm 2 Hamburg). Versuchsdauer: 42 Stunden.

	Umsatz in Mmol	Umsatz in Mmol pro Mmol Citrat	% C	% H
<i>Verschwunden:</i>				
Citronensäure	3,1	1	100	100
<i>Erhalten:</i>				
CO ₂	3,76	1,21	20,2	0
HCOOH	1,7	0,55	9,2	6,1
CH ₃ .COOH	5,4	1,74	58,1	77,3
(CH ₂ .COOH) ₂	0,51	0,165	11,0	12,8
			total: 98,5	96,2
			$\frac{\% H}{\% C} = 0,98$	

Tabelle 6.

Ansatz: 3 Mmol Na_2 -Oxalacetat in 250 ccm $m/_{15}$ -Phosphatpuffer (pH = 6,8); 75 mg Bakterien, normal gezüchtet (Stamm 2 Hamburg). Versuchsdauer: 42 Stunden.

	Umsatz in Mmol	Umsatz in Mmol pro Mmol Oxal- acetat	% C	% H
<i>Verschwunden:</i>				
Oxalessigsäure	3	1	100	100
<i>Erhalten:</i>				
CO ₂	3,66	1,22	30,5	0
HCOOH	1,58	0,53	13,3	10,6
CH ₃ .COOH	1,98	0,66	33,0	52,8
(CH ₂ .COOH) ₂	0,48	0,16	16,5	22,4
			total: 93,3	85,8
			$\frac{\% H}{\% C} = 0,92$	

Das Hauptergebnis der in Tab. 3—6 niedergelegten Versuche ist, daß sich die vergorene Citronensäure bzw. Oxalessigsäure bei *B. pyocyaneum* ebenso wie früher bei *B. lactis aerogenes fast vollständig* in den Produkten CO₂, Ameisensäure, Essigsäure und Bernsteinsäure wiederfindet; sogar in quantitativer Hinsicht bestehen keine grundsätzlichen Abweichungen

zwischen den beiden Organismen, wie aus folgender Gegenüberstellung unserer neuen und der früheren Resultate Deffners (sämtliche Werte in Mmol) hervorgeht:

Tabelle 7.

Pro Mmol Substrat	CO ₂	HCOOH	CH ₃ .COOH	CH ₂ .COOH CH ₂ .COOH
a) Citronensäure				
B. lactis aerogenes	1,1 — 1,35	0,23—0,38	1,68—1,86	0,10—0,24
B. pyocyaneum . .	1,21—1,50	0,33—0,55	1,60—1,74	0,15—0,17
b) Oxalessigsäure				
B. lactis aerogenes	1,20—1,30	0,34—0,43	0,46—0,68	0,17—0,23
B. pyocyaneum . .	1,22	0,53	0,66	0,16

Besonders wichtig erscheint uns wieder der Vergleich der Parallelversuche mit Citronensäure und Oxalessigsäure: wie die (fettgedruckten) Zahlen in Tab. 5 und 6 erkennen lassen, ergibt sich als einziger Unterschied der Bilanzen der, daß aus Citronensäure rund 1 Mmol Essigsäure mehr erhalten wird als aus Oxalessigsäure. Dieser — gleichfalls schon bei Hefe-*Aerogenes* beobachtete — Tatbestand scheint uns zusammen mit den gut stimmenden Kohlenstoff- und Oxydoreduktionsbilanzen der Tab. 3—6 die wichtigste Stütze unseres zu Eingang dieser Arbeit entwickelten Abbauschemas zu sein; weder die Vorstellungen von Butterworth und Walker noch diejenigen von Martius vermögen — wie im Abschnitt V noch näher dargetan werden wird — den beobachteten *quantitativen* Verhältnissen gerecht zu werden, ganz abgesehen davon, daß das tatsächliche Verhalten der Bakterien gegenüber den „Schlüsselsubstanzen“ dieser Theorien deren intermediäre Entstehung beim Citratabbau so gut wie ausschließt.

Im einzelnen ist zu den Versuchen der Tab. 3—6 noch folgendes zu bemerken:

Die *C-Bilanzen* der Ansätze 3 und 5 stimmen ausgezeichnet, die der Ansätze 4 und 6 weniger gut. Im Fall der *Oxalessigsäure* ist dies — in Anbetracht der Unbeständigkeit des Substrats — verständlich; hier ist insbesondere an die Entstehung

von Brenztraubensäure zu denken, die — wie schon Wieland, Crawford und Walch (a. a. O., S. 88) gefunden haben — unter der Einwirkung der Bakterien in zum Teil nicht definierte Sekundärprodukte übergeht. Versuch 4 andererseits ist der einzige, bei dem die eingesetzte Citronensäure in der Versuchszeit nicht vollständig umgesetzt worden ist. Ganz abgesehen davon, daß ein Fehler in der Citronensäurebestimmung die gesamten Werte der Reaktionsprodukte in der gleichen Richtung und im gleichen Ausmaß zu fälschen vermag, ist gerade bei diesem noch „unfertigen“ Versuch damit zu rechnen, daß Zwischenprodukte (wie z. B. Äpfelsäure, Fumarsäure, Brenztraubensäure u. dgl.) im Ansatz vorhanden waren, die sich bei der schematischen Aufarbeitung der Bestimmung entzogen.

Die *H-Bilanzen* liegen, wie sich aus den stets angegebenen Quotienten Proc. H/Proc. C ersehen läßt, durchweg einige Proc. unter den C-Werten. Dies ist erklärlich, da wir gewisse, in kleiner Menge entstandene Produkte relativ hoher „H-Kapazität“, wie Alkohol, Milchsäure (eventuell auch mol. H₂) nicht quantitativ bestimmt haben. Wären beispielsweise, wie dies Deffner früher bei einem vollständigen Bilanzversuch an *Aerogenes* gefunden hatte, pro Mmol Citronensäure noch 0,09 Mmol H₂ und 0,043 Mmol C₂H₅OH entstanden, so würde sich hierdurch die C-Bilanz um 1,4 Proc., die H-Bilanz indes um 3,9 Proc. erhöhen.

Im Hinblick auf die kleineren Unterschiede im relativen Anteil der einzelnen Reaktionsprodukte, die sowohl bei verschiedenen *Stämmen* der gleichen Art (Tab. 3—6) — eventuell verstärkt durch Variation der Versuchsbedingungen —, als auch bei verschiedenen *Spezies* (Tab. 7) auftreten, scheint uns folgender Hinweis nicht überflüssig: in unserem Schema sind lediglich die *oxydoreduktiven* Teilreaktionen Ia und Ib (S. 86) zwangsläufig miteinander gekoppelt, der Anteil dieser oxydoreduktiven Phase und der „*hydroklastischen*“ Reaktion Ic am Gesamtumsatz der nach I entstandenen Oxalessigsäure kann indes — stöchiometrisch, doch wohl nicht energetisch — in weiten Grenzen variieren und er tut es auch nach unseren Versuchsergebnissen, wenngleich in bescheidenem Ausmaß.

In der nachstehenden Tab. 8 sind in der ersten Spalte einige Kombinationsmöglichkeiten der Gleichungen I—Ic gegeben und in den folgenden Spalten die sich hieraus für den Umsatz eines Mols Citronensäure ergebenden Molzahlen der Reaktionsprodukte.

Tabelle 8.

Pro Mol Citronensäure	CO ₂	HCOOH	CH ₃ ·COOH	CH ₂ ·COOH CH ₂ ·COOH
A) 4.I + 1.Ia + 2.Ib + 1.Ic	1,25	0,25	1,75	0,25
B) 5.I + 1.Ia + 2.Ib + 2.Ic	1,20	0,40	1,80	0,20
C) 6.I + 1.Ia + 2.Ib + 3.Ic	1,17	0,50	1,84	0,167

Man erkennt so z. B. beim Vergleich mit Tab. 5, daß der dort wiedergegebene Versuch sich am besten mit Schema C der Tab. 8 in Einklang bringen läßt, während ein Versuch aus der früheren Arbeit Deffners mit *B. aerogenes*, bei dem 1,09 Mmol CO₂, 0,23 Mmol HCOOH, 1,68 Mmol CH₃·COOH und 0,24 Mmol (CH₂ COOH)₂ erhalten worden waren, sich zwanglos Schema A fügt.

Fast regelmäßig zu tief, und zwar in dieser wie in der vorausgegangenen Untersuchung, fallen die *Bernsteinsäure*-werte aus. Zweifellos hängt dies mit der Reinigungsmethode, bei der KMnO₄ in saurer Lösung und in der Hitze zur Anwendung kommt, zusammen. Im besonderen ist dabei zu bedenken, daß die Hydrierungsreaktion Ia sich in 2 Stufen vollzieht, wobei primär Äpfel- bzw. Fumarsäure entstehen. Kleinere Mengen dieser Säuren, die auf dem Reduktionsweg liegen geblieben sein können, werden durch die Permanganatbehandlung zerstört und entgehen so der Bilanz.

IV. Weitere Angaben über den Citratabbau durch Bakterien.

Da uns aus äußeren Gründen keine Zeit mehr zur experimentellen Untersuchung weiterer Bakterien zur Verfügung stand, haben wir die Ergebnisse anderer Autoren zur Prüfung des Gültigkeitsbereichs unseres Abbauschemas herangezogen¹⁾.

¹⁾ Zusammenstellung älterer Arbeiten bei K. Bernhauer, *Die oxydativen Gärungen*, S. 103f. (Berlin 1932).

Da es sich hierbei zum Teil um ältere, durchweg mit proliferierenden Organismen und meist nicht unter streng anaeroben Bedingungen ausgeführte Versuche handelt, darf an das Material von vorne herein kein allzu strenger Maßstab angelegt werden. Im allgemeinen ist auch nur das eine oder andere Reaktionsprodukt quantitativ bestimmt worden, lediglich von Bruce¹⁾ sind bei *B. suipestifer* vollständige Bilanzen aufgestellt worden. Wir geben nachstehend die bei den einzelnen Arten gewonnenen Resultate.

B. lactis aerogenes [A. W. Bosworth u. Prucha²⁾ 1911]: Pro Mol vergorener Citronensäure werden in 2 Parallelversuchen 1,85 und 2,0 Mol flüchtiger Säure erhalten, die auf Grund qualitativ nachgewiesener d-Toluididbildung als Essigsäure angesprochen wird, in Wirklichkeit jedoch aus Essigsäure + Ameisensäure bestand. Nach Tab. 8 lassen sich für $\text{CH}_3\text{.COOH} + \text{HCOOH}$ Werte zwischen 2,0 und 2,35 erwarten.

B. coli commune [E. C. Grey³⁾ 1924]: Der Autor läßt die Bakterien auf die Citronensäure in Gegenwart von Ca-Formiat einwirken, wodurch wohl ziemlich zuverlässig anaerobe Verhältnisse gewährleistet waren. Bestimmt wurden CO_2 , Essigsäure und Bernsteinsäure. Der CO_2 -Wert ist unter den angegebenen Bedingungen nicht brauchbar, an Essigsäure werden 1,88, an Bernsteinsäure 0,14 Mol pro Mol abgebauter Citronensäure gefunden, was mit Schema C, Tab. 8, gut zu vereinbaren ist.

B. suipestifer [H. C. Brown, Duncan u. Henry⁴⁾ 1924]: Die Menge flüchtiger Säure liegt zwischen 1,7 und 2,1 Mol pro Mol Citronensäure. Sie wird auf Grund einer Ag-Salzfällung wiederum als Essigsäure angesprochen, doch gilt auch hier das oben schon bei *B. lactis aerogenes* Gesagte.

B. aertrycke [W. F. Bruce¹⁾ 1934]: Wir haben die in der Arbeit mitgeteilten Versuche durch Vergleich der C- und der H-Bilanzen kritisch gesichtet. Versuch 1, bei dem nur HCOOH (0,25 Mol), $\text{CH}_3\text{.COOH}$ (1,5 Mol) und $(\text{CH}_2\text{.COOH})_2$ (0,75 Mol, alle Zahlen auf 1 Mol abgebauten Citrats umgerechnet) bestimmt wurden, ist ersichtlich — und zwar infolge des viel zu hohen Bernsteinsäurewertes — falsch, da bei der C-Bilanz schon ohne den CO_2 -Wert 104,2 Proc., bei der H-Bilanz gar 128,1 Proc. erreicht werden. Auch Versuch 2, bei dem alle Produkte bestimmt wurden, ist für unsere Zwecke unbrauchbar, da bei der Bilanz aufstellung zwar 94,2 Proc. C, aber nur 71,6 Proc. H resultieren. An den Mengen der pro Mol abgebauter Citronensäure erhaltenen Reaktionsprodukte [2,37 Mol CO_2 , 0,14 Mol HCOOH , 0,92 Mol $\text{CH}_3\text{.COOH}$, 0,31 Mol

¹⁾ J. biol. Chem. 107, 119 (1934).

²⁾ J. biol. Chem. 8, 479 (1911).

³⁾ Proc. Roy. Soc. (B) 96, 156 (1924).

⁴⁾ J. Hygiene 28, 1 (1924).

($\text{CH}_2\text{.COOH}$)₂] fällt auf, daß der CO_2 - und der Bernsteinsäure-wert abnorm hoch, der Ameisensäure- und Essigsäure-wert ungewöhnlich tief liegen. Diese Feststellung zusammen mit der Inkongruenz von C- und H-Bilanz läßt den fast sicheren Schluß zu, daß in diesem Falle nicht streng anaerob gearbeitet wurde, wodurch ein Teil der Ameisensäure zu CO_2 , ein Teil der Essigsäure wohl zu Bernsteinsäure oxydiert worden ist. Versuch 3 endlich mit 91,5 Proc. C und 88,1 Proc. H ist bilanzmäßig ziemlich befriedigend. Pro Mol vergorener Citronensäure — der geringe Citratverlust durch Zellsynthese ist hier wie im Versuch 2 schon abgezogen — werden erhalten (in Mol)

CO_2	HCOOH	$\text{CH}_3\text{.COOH}$	$(\text{CH}_2\text{.COOH})_2$	$\text{CH}_3\text{.CHOH.COOH}$
1,36	0,39	1,47	0,13	0,01

Vergleicht man diese Zahlen — unter Berücksichtigung des Umstandes, daß sie wegen der nur auf rund 90 Proc. aufgehenden Bilanzen durchweg zu tief liegen dürften — mit denen der Tab. 7, so sieht man, daß sie im allgemeinen innerhalb der Streubreite der von uns für zwei ganz verschiedene Mikroorganismen festgestellten Werte liegen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in der Literatur vorhandenen quantitativen Angaben über Produkte der bakteriellen Citratvergärung, soweit sie einer kritischen Betrachtung standhalten, in keinem Falle unserem Schema widersprechen, dieses vielmehr, wie besonders in dem allein eingehender untersuchten Beispiel des *B. aertrycke*, wesentlich stützen. Da dieses Abbauschema nunmehr sowohl für Vertreter der *Coli-Aerogenes*-gruppe als auch der Genera *Pseudomonas* und *Salmonella* seine Bestätigung gefunden hat, sind wir geneigt, seine allgemeine Gültigkeit für den Citratumsatz durch Bakterien anzunehmen.

V. Andere Theorien des biologischen Citronensäureabbaus und ihre Nachprüfung an Bakterien.

Die Zuckervergärung beginnt bekanntlich mit einer *Spaltungsreaktion*, die als Umkehrung einer Aldolkondensation aufzufassen ist und durch ein reversibel wirkendes Enzym *Aldolase*¹⁾ katalysiert wird. Erst durch sie werden Substrate geschaffen, an denen das für die verschiedenen Gärungsformen charakteristische Spiel der *Oxydoreduktionen* einsetzen kann. Auch die Vergärung der *Citronensäure*, deren Molekül keine

¹⁾ O. Meyerhof, Lohmann u. Schuster, Bio. Z. 286, 301, 336 (1936).

erkennbare Möglichkeit zu einer intramolekularen Disproportionierung besitzt, beginnt nach unserer Auffassung mit einer derartigen „Desaldolisierung“, für die wohl ein der Meyerhofschen Aldolase verwandtes Enzym verantwortlich zu machen ist. Vom gleichen Reaktionstyp wie die Spaltung in Oxalessigsäure + Essigsäure ist aber im Prinzip auch die Spaltung in Acetondicarbonsäure + Ameisensäure, die zuerst Walker (a. a. O., S. 86) für den Citratabbau durch Mikroben angenommen hat und die Wieland und Sonderhoff (a. a. O., S. 88) später eingehend diskutiert haben.

Von anderer Art ist das Abbauschema, das Martius für tierisches Gewebe entwickelt und bewiesen hat und das er neuerdings auch auf die bakterielle Citratvergärung zu übertragen sucht (a. a. O., S. 87). Hier steht, nachdem der primäre Isomerisierungsprozeß zu Isocitronensäure einmal abgelaufen ist, am Beginn des eigentlichen Abbaus eine eindeutige *Dehydrierungsreaktion*, deren Forderung nach einem *Acceptor* mit den streng anaeroben Bedingungen unserer Versuche von vorne herein in Widerspruch steht. Soweit wir übersehen können, bestehen *prinzipiell* nur zwei Möglichkeiten zur Behebung dieses Widerspruchs. Davon läßt sich die eine, daß nämlich *zelleigene* Acceptoren der Bakterien den gelockerten Wasserstoff der Isocitronensäure quantitativ aufnehmen würden, auf Grund einer einfachen Überlegung ausschalten.

Im Versuch der Tab. 3 (S. 98) setzen z. B. 45 mg Bakterien (Trockengewicht) 3 Mmol Citronensäure um. In diesen 45 mg ist etwa die Hälfte Kohlenstoff, was rund 2 *Milli-atom C* entspricht. Ihnen steht ein H-Angebot bei der primären Substratdehydrierung von 6 *Milli-atom H* gegenüber. Die außerordentlich konstante Zusammensetzung der lebenden Substanz schließt eine „Zellhydrierung“ in dem hier in Frage kommenden Ausmaß vollkommen aus. Ganz abgesehen davon würde das Verschwinden zweier H-Atome in unseren H-Bilanzen ein Defizit von über 10 Proc. bedingen.

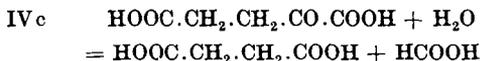
Zum wenigsten *diskutierbar* ist die zweite Möglichkeit, daß in einer *Angärungsphase* zwar Zellacceptoren einspringen, daß aber im *stationären Zustand* die beiden H-Atome der Isocitronensäure das bei der Decarboxylierung der Oxalbernsteinsäure entstehende CO₂ (vgl. Gleichung IIIa, S. 87) zu *Ameisensäure* hydrieren, nach der summarischen Gleichung IV

bernsteinsäure (nach IVb) deren Konzentration im Reaktionssystem IVa dauernd so niedrig gehalten werden, daß nach dem Massenwirkungsgesetz eine starke Gleichgewichtsverlagerung in IVa von links nach rechts erfolgt.

Liegt also die anaerobe Entstehung von Ameisensäure + α -Ketoglutarensäure — wenigstens für gewisse Mikroorganismen — durchaus im Bereich der Möglichkeit, so erhebt sich nunmehr die Frage, ob der sekundäre Abbau der letzteren mit den von uns in den beiden vorausgegangenen Abschnitten aufgezeigten quantitativen Verhältnissen bei der Citratvergärung in Einklang gebracht werden kann.

Bei der versuchsweisen Aufstellung theoretischer Bilanzen — ähnlich denen der Tab. 8 — halten wir uns an die schon in der Einleitung erwähnten Grundvorstellungen von Martius, wonach die *Bernsteinsäure* stets direkt aus α -Ketoglutarensäure, die annähernd 2 Moleküle *Essigsäure* (und eventuell *Aceton*, worauf jedoch nach den Ergebnissen des Abschnitts III nicht mehr näher eingegangen werden soll) nach einem — in enzymatischer Beziehung allerdings teilweise hypothetischen — stufenweisen Umbau zu β -Keto-glutarensäure (= Acetondicarbonensäure) gebildet werden (vgl. S. 87).

Eine sich an IVb anschließende Spaltung der α -Ketoglutarensäure in $\text{HCOOH} + \text{Bernsteinsäure}$ (IVc)



bietet nach dem bekannten Verhalten von Bakterien gegenüber anderen Ketosäuren¹⁾ dem Verständnis keine Schwierigkeit.

Andererseits kann die Acetondicarbonensäure nur nach der ad hoc angenommenen Reaktion IVd



2 Moleküle *Essigsäure* liefern.

Ähnlich wie dies früher (S. 101 und Tab. 8) bei der Diskussion des Deffnerschen Schemas für den sekundären Abbau der *Oxalessigsäure* geschehen ist, kann im vorliegenden Falle der Umsatz der „Schlüsselsubstanz“ *Ketoglutarensäure* zu *Bernsteinsäure* + HCOOH (nach IVc) mit beliebigen Vielfachen der zu *Essigsäure* + CO_2 führenden Reaktion IVd kombiniert werden. Dies ist in zahlenmäßiger Analogie zu Tab. 8 in der folgenden Tab. 9 geschehen, wo wiederum die Molzahlen der Produkte pro Mol vergorener Citronensäure angegeben sind.

¹⁾ Vgl. z. B. C. Neuberg u. Mitarbeiter, *Bio. Z.* **67**, 90 (1914); **71**, 122 (1915); ferner H. Wieland, Crawford u. Walch, *a. a. O.*, S. 88.

Tabelle 9.

Pro Mol Citronensäure	CO ₂	HCOOH	CH ₃ .COOH	CH ₂ .COOH
				CH ₂ .COOH
A) 4.IV + 1.IVc + 3.IVd	0,75	1,25	1,50	0,25
B) 5.IV + 1.IVc + 4.IVd	0,80	1,20	1,60	0,20
C) 6.IV + 1.IVc + 5.IVd	0,83	1,17	1,67	0,167

Der Vergleich der obenstehenden theoretischen Zahlenwerte mit den beim bakteriellen Citratabbau tatsächlich gefundenen (Tab. 3—7) beweist eindeutig, daß die — soweit wir sehen können — einzig mögliche streng anaerobe Abbaufolge im Sinne von Martius den experimentellen Tatsachen nicht gerecht wird. Die HCOOH-Werte der Tab. 9 liegen viel höher, die CO₂-Werte viel tiefer als im Experiment; die CH₃.COOH-Werte liegen ebenfalls zu tief, doch teilweise nahe an der Fehlergrenze. Vollends hat das Schema von Martius keine plausible Erklärung für die nunmehr an zwei ganz verschiedenen Bakterienspezies experimentell belegte weitgehende Analogie im Abbau von Oxalessigsäure und Citronensäure.

Die anderen von Martius in Betracht gezogenen Deutungsmöglichkeiten für die Entstehung von Essigsäure und Aceton kommen für unsere Versuchsbedingungen und die von uns verwendeten Organismen nicht in Frage. Dies gilt beispielsweise für die Annahme einer intermediären Synthese von *Glutaminsäure* aus α -Ketoglutarsäure + NH₃, an die sich, wie Neuberg¹⁾ schon 1908 bei Fäulnisvorgängen nachgewiesen hat, Abbau zu *Buttersäure* anschließen könnte, „aus welcher dann weiterhin sowohl Essigsäure wie auch Aceton entstehen können“. Wir haben indes, im Gegensatz zu den von Martius zitierten älteren Untersuchern des bakteriellen Citratabbaus, mit *ruhenden* Bakterien *ohne* Zusatz einer N-Quelle gearbeitet; zudem scheint der — neuerdings wiederholt präparativ untersuchte²⁾ — Abbau der Glutaminsäure zu Buttersäure auf die Gattung der *anaeroben* Bazillen (*Clostridium*) beschränkt zu sein, denen die Fähigkeit zum *direkten* Citratangriff höchstwahrscheinlich abgeht³⁾.

Als Hauptargument für die Auffassung von Martius, „daß nicht nur im Tierkörper, sondern auch in der Bakterienzelle der Citratabbau

¹⁾ Bio. Z. 13, 299 (1908).

²⁾ H. A. Barker, Enzymol. 2, 175 (1938); D. D. Woods u. Clifton, Biochem. J. 32, 345 (1938).

³⁾ Vgl. hierzu W. Kocholaty u. Hoogerheide, Biochem. J. 32, 437 (1938).

über Isocitronensäure–Ketoglutarsäure verläuft“, bleibt der Nachweis von Aconitase (S. 87) in Suspensionen ruhender Bakterien (*B. coli*, *B. prodigiosum*, *B. pyocyaneum*), obwohl der in der zweiten Arbeit von Martius angeführte Versuch an *B. prodigiosum* natürlich nicht darüber zu entscheiden gestattet, ob Citronensäure über Isocitronensäure abgebaut wird oder umgekehrt. Überhaupt muß man unseres Erachtens gerade bei Bakterien mit derartigen teleologischen Beweisen sehr vorsichtig sein, da schon vor längerer Zeit Quastel¹⁾ gezeigt hat, daß z. B. *B. coli* eine ganze Reihe von Substraten zu *dehydrieren* vermag, mit denen dieser Organismus vermutlich nie in seinem Leben in Berührung kommen wird. Hier spielen sehr stark die Spezifitätsverhältnisse der Bakterienenzyme herein, die in ungewöhnlicher Weise durch Vorbehandlung und Zustand der Zelle bestimmt und modifiziert werden. Darüber hinaus sei an die weite Verbreitung eines Enzyms wie *Glyoxalase* in den verschiedensten Zellen und Geweben²⁾ hingewiesen, trotz der heutigen Erkenntnis, daß der *Hauptweg* der Glykolyse (soweit für die Annahme eines Nebenwegs in manchen Fällen überhaupt Veranlassung besteht) bestimmt *nicht* über Methylglyoxal verläuft.

Zur weiteren Prüfung und kritischen Vergleichung unseres Abbauschemas mit den von Martius (und teilweise Walker) vertretenen Mechanismen haben wir sowohl mit *B. pyocyaneum* als auch *B. aerogenes* (aus Hefe) orientierende anaerobe Abbauversuche an den Stoffpaaren α -Ketoglutarsäure + $HCOOH$ und Acetondicarbonsäure + $HCOOH$ ausgeführt. Da wir stets äquimolare Mengen der beiden Komponenten einsetzten, entspricht also die erste Kombination dem Zustand nach der Primärsplaltung IV, die zweite dem Zustand nach der „Isomerisierung“ der α - zur β -Ketosäure im Sinne von Martius (S. 87 und 107) und gleichzeitig demjenigen nach der Primärreaktion II (S. 86) von Walker.

Wir haben insgesamt 3 Versuchsreihen ausgeführt, die beiden ersten mit zwei verschiedenen *Pyocyaneum*-Stämmen, die letzte mit einem *Aerogenes*-Stamm (aus Hefe). In der ersten Reihe war die Versuchstemperatur 32°, die Bakterienmenge 40 mg. Da sich unter diesen Bedingungen keine eindeutigen Umsätze beobachten ließen, wurde in den beiden folgenden Reihen durch Erhöhung der Temperatur auf 37° und der

¹⁾ Biochem. J. 20, 166 (1926); Erg. Enzymforschg 1, 209 (1932).

²⁾ Literatur bei C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, Suppl. S. 1416 (Den Haag 1938).

Bakterienmenge auf 120 bzw. 180 mg ein Umsatz zu „erzwingen“ versucht. Parallelversuche mit *Citronensäure* liefen stets nebenher und zeigten durch ihre normale Ablaufgeschwindigkeit im Vergleich zu früher ausgeführten Ansätzen, daß aktive Bakteriensuspensionen zur Anwendung gekommen waren.

Züchtung und Aufbereitung der Bakterien sowie allgemeine Versuchsanordnung entsprach derjenigen der Ansätze von Tab. 3—6.

A. In den Ansätzen mit α -Ketoglutar säure wurde wie in den Citronensäure-versuchen nach Ablauf der Versuchszeit mit H_2SO_4 angesäuert, bei Wasserbadtemperatur das CO_2 mit N_2 ausgetrieben und in titrierter $Ba(OH)_2$ -Lösung aufgefangen. Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert, die flüchtigen Säuren abdestilliert und im Destillationsrückstand nach dem Enteiweißen mit $Na_2WO_4 + H_2SO_4$ durch Zusatz von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 n-HCl die noch vorhandene α -Ketoglutar säure gefällt und gravimetrisch bestimmt. Kontrollbestimmungen mit bekannter Ketoglutar säure-menge ergaben, daß bei dieser Aufarbeitungsmethode mit einem Ketosäureverlust von rund 10 Proc. zu rechnen ist. In einem Parallelansatz zu Versuch A der Tab. 11 wurde der Destillationsrückstand der flüchtigen Säuren ohne vorhergehende Enteiweißung mit Äther 10 Stunden lang extrahiert und der Verdunstungsrückstand des Äther-extrakts (376 mg) mit n-NaOH titriert. Laugeverbrauch: 5,2 ccm, entsprechend einem Säureäquivalent von 72,4; berechnet für Ketoglutar säure 73,0. Die Übereinstimmung zeigt, daß keine bestimmbar Mengen *Bernsteinsäure* entstanden waren.

B. In den Ansätzen mit *Acetondicarbon säure* wurde nach Beendigung des Versuchs zunächst durch 5-stündiges Durchleiten von N_2 durch die angesäuerte Lösung bei Zimmertemperatur das CO_2 ausgetrieben. (Die erhaltenen CO_2 -Werte sind in den folgenden Tabellen in Klammern wiedergegeben, da ein unbekannter Bruchteil des CO_2 während der Austreibungsperiode entstanden sein kann¹⁾). Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Ansätze halbiert: in der einen Hälfte wurden wie oben die flüchtigen Säuren bestimmt, in der anderen — ohne vorhergehende Enteiweißung — nach S. 95 das Aceton. (Es ist in den folgenden drei Tabellen als *Acetondicarbon säure* ausgedrückt, da nach dem eben Gesagten die Verteilung von Aceton und *Acetondicarbon säure* am Versuchsende nicht bekannt ist.) Kontrollversuche mit bekannter Säuremenge ergaben bei dieser Bestimmungsmethode ein Defizit von 5—10 Proc. Im Versuch B der Tab. 11 wurde außerdem der Destillationsrückstand der Aceton-

¹⁾ Bei leicht decarboxylierbaren Ketodicarbon säuren ist die Zersetzlichkeit der freien Säure und insbesondere des primären Anions erheblich größer als die des sekundären Anions. Vgl. E. O. Wiig, J. phys. Chem. 32, 961 (1928); W. Franke u. Brathuhn, A. 487, 1 (1931).

bestimmung, wie unter A. angegeben, mit Äther extrahiert. In dem geringfügigen Rückstand des Ätherextrakts war nach der Oxydation mit KMnO_4 keine wägbare Bernsteinsäure-menge zu fassen.

Tabelle 10.

Ansätze: 3 Mmol Substrat (als neutrales Na-Salz) in 100 ccm $m/25$ -Phosphatpuffer (pH 6,8); 40 mg (Trockengewicht) *B. pyocyaneum* (Stamm 2 Hamburg). Versuchsdauer: 50 Stunden; $T = 32^\circ$.

Eingesetzt:	A. α -Ketoglutarsäure (3 Mmol) + HCOOH (3 Mmol)	B. Acetondicarbon- säure (3 Mmol) + HCOOH (3 Mmol)	C. Citronensäure (3 Mmol)
(Zurück) erhalten:			
α -Ketoglutarsäure .	2,54	—	—
Acetondicarbonsäure	—	2,84	—
Citronensäure . . .	—	—	0,9
Flüchtige Säuren. .	3,0	3,0	nicht bestimmt
Davon HCOOH .	2,9	3,0	" "
CO_2	nicht bestimmt	nicht bestimmt	" 2,6 "

Tabelle 11.

Ansätze: 3 Mmol Substrat in 250 ccm $m/30$ -Phosphatpuffer (pH 7,0); 120 mg *B. pyocyaneum* (Stamm 1 München). Versuchsdauer: 40 Stunden; $T = 37^\circ$.

Eingesetzt:	A. α Ketoglutarsäure (3 Mmol) + HCOOH (3 Mmol)	B. Acetondicarbon- säure (3 Mmol) + HCOOH (3 Mmol)	C. Citronensäure (3 Mmol)
(Zurück) erhalten:			
α -Ketoglutarsäure .	2,45	—	—
Acetondicarbonsäure	—	2,7	—
Citronensäure . . .	—	—	0
Flüchtige Säuren. .	2,8	2,9	nicht bestimmt
Davon HCOOH .	2,8	2,9	" "
CO_2	0,35	(3,15)	" 4,15 "

Das eindeutige, indes nach den früheren Versuchen und Überlegungen nicht mehr überraschende Ergebnis der Tab. 10 bis 12 ist, daß unter Bedingungen, unter denen Citronensäure weitgehend abgebaut wird, α - und β -Ketoglutarsäure im Gemisch mit HCOOH überhaupt nicht angegriffen werden

(Tab. 10); der *vollständigen* Vergärung der Citronensäure in den Tab. 11 und 12 entspricht zwar ein geringfügiger — bei Berücksichtigung der Fehlergrenze der Bestimmungen 10 Proc. nicht übersteigender — Schwund der beiden Ketoglutarensäuren, der jedoch *nicht* zur Bildung von *Essigsäure* führt.

Tabelle 12.

Ansätze: 3 Mmol Substrat in 250 ccm $m/30$ -Phosphatpuffer (p_H 7,0); 180 mg *B. lactis aerogenes* (aus Hefe). *Versuchsdauer:* 40 Stunden; $T = 37^\circ$.

<i>Fingesetzt:</i>	A. <i>α-Ketoglutar- säure</i> (3 Mmol) + <i>HCOOH</i> (3 Mmol)	B. <i>Acetondicarbon- säure</i> (3 Mmol) + <i>HCOOH</i> (3 Mmol)	C. <i>Citronensäure</i> (3 Mmol)
<i>(Zurück) erhalten:</i>			
α -Ketoglutarensäure .	2,38	—	—
Acetondicarbonsäure .	—	2,6	—
Citronensäure	—	—	0
Flüchtige Säuren .	2,4	2,45	nicht bestimmt
Davon HCOOH .	2,4	2,33	" "
CO ₂	0,6	(2,66)	4,05

Was hierbei aus den beiden Ketosäuren entsteht, haben wir — als außerhalb unseres Programms liegend — nicht untersucht. Es ist jedoch — zum mindesten für den Versuch mit *Aerogenes* (Tab. 12), in dem gleichzeitig ein nicht unerheblicher HCOOH-Schwund festzustellen ist — recht wahrscheinlich, daß die (nach S. 106 thermodynamisch stark begünstigte) Reduktion zu den entsprechenden *Oxyglutar Säuren* stattfindet.

VI. Aerobe Versuche mit Citronensäure und den vermuteten Zwischenstufen ihres Abbaus.

In diesen abschließenden Versuchen sollte nochmals, und zwar unter Bedingungen, die von den bisher angewandten möglichst abwichen, die Frage geprüft werden, welche Verbindungen als Intermediärprodukte des bakteriellen Citratabbaus in Betracht kämen. Geeignet hierzu erschien die aerobe manometrische Methodik nach Barcroft-Warburg, einmal wegen ihrer Einfachheit und Eignung zu Reihenversuchen, dann wegen der Möglichkeit, auch die *Kinetik* stärker als bisher zur Entscheidung heranzuziehen. Hauptkriterium für die mögliche Funktion einer Substanz als Zwischenstufe ist dabei,

daß sie nicht langsamer angegriffen wird als das Ausgangs-
substrat, wobei allerdings nach den neueren Erfahrungen unter
Umständen mit sekundären Komplikationen, wie gesteigerte
Reaktionsfähigkeit eines Stoffes in statu nascendi¹⁾, Hemmung
durch zu hohe Substratkonzentration²⁾, sowie durch optische
Antipoden³⁾, zu rechnen ist.

Wir geben zunächst zwei typische Versuchsreihen dieser
Art, ausgeführt an je einem Stamm von *B. pyocyaneum* und
B. lactis aerogenes (aus Hefe) in den Fig. 3 und 4 wieder.

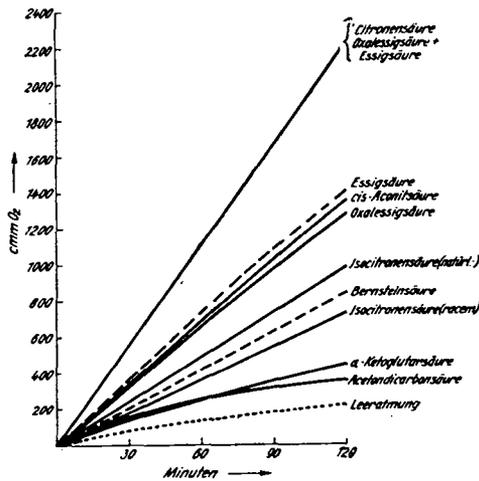


Fig. 3.

B. pyocyaneum und verschiedene Substrate.

Die verwendeten Bakterien waren jeweils 48 Stunden auf dem S. 91
angegebenen synthetischen Citratnährboden anaerob gezüchtet worden.
Die Ansätze, die bei 37° unter Luft liefen, waren folgendermaßen zu-
sammengesetzt:

- 2 ccm Bakterien-suspension (15 mg Trockengewicht bei *B. pyocyaneum*,
10 mg bei *B. lactis aerogenes*);
- 1 ccm $m/5$ -Phosphatpuffer (pH 6,8);
- 2 ccm $m/50$ -Substratlösung (als neutrales Na-Salz).

¹⁾ Vgl. z. B. H. Wieland, Helv. 15, 521 (1932); J. Weichherz u.
Nord, Protopl. 10, 41 (1930).

²⁾ Vgl. z. B. W. Franke u. Peris, Bio. Z. 295, 61 (1937).

³⁾ Vgl. H. Wieland, Crawford u. Walch, A. 525, 119 (1936).

Wir haben das grundsätzliche Ergebnis der in den Fig. 3 und 4 wiedergegebenen Versuche in zahlreichen weiteren Versuchsreihen, in denen teils die verwendeten Bakterienstämme, teils die Züchtung und Vorbehandlung der Organismen variiert wurden, stets bestätigen können, wenn auch im einzelnen

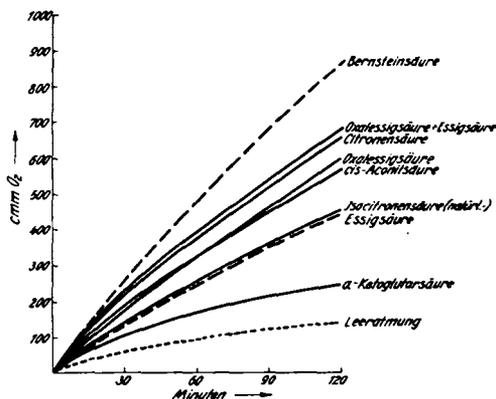


Fig. 4.

B. lactis aerogenes und verschiedene Substrate.

kleinere quantitative Abweichungen bestanden. Tab. 13 enthält in abgekürzter Form eine Zusammenstellung einiger weiterer derartiger Versuchsdaten.

Tabelle 13.

	cem O ₂			
	<i>B. pyocyaneum</i>		<i>B. lactis aerogenes</i>	
	60'	120'	60'	120'
Leeratmung	75 (100)	135	85 (70)	135
Citronensäure	1140 (910)	2160	370 (500)	660
Oxalessigsäure + Essigsäure	1050 —	2170	—	—
Oxalessigsäure	500 (575)	1100	—	—
Essigsäure	800 —	1450	—	—
cis-Aconitsäure	635 —	1450	—	—
Isocitronensäure (natürl. —)	420 —	560	225 —	420
" (racem.)	200 (175)	380	— (100)	—
α-Ketoglutar Säure	— (140)	—	— (175)	—
Acetondicarbonsäure	— (130)	—	—	—

Der Versuchsansatz war der oben angegebene mit durchweg 10 mg Bakterien. Bei beiden Bakterienarten handelt es sich um je zwei mit

verschiedenen Kulturen ausgeführte Versuchsreihen, von denen im einen Falle die 1- und 2-Stunden-Werte, im anderen (in Klammern) nur die 1-Stunden-Werte der O₂-Aufnahme mitgeteilt werden.

Als wichtigstes Ergebnis der Versuche dieses Abschnitts sehen wir die Tatsache an, daß alle durch die Theorien von Martius und Walker in Betracht gezogenen Intermediärstufen auch unter *aeroben* Bedingungen zu langsam angegriffen werden, um die tatsächliche Geschwindigkeit des oxydativen Citronensäure-abbaus erklären zu können. Im besonderen scheiden α -Ketoglutarinsäure und Acetondicarbonsäure, genau wie in den *anaeroben* Versuchen (S. 111 f.), infolge ihrer außerordentlichen Reaktionsträgheit von vorne herein aus. Beachtenswert erscheint uns ferner die Geschwindigkeitsabstufung innerhalb der Gruppe der C₆-Tricarbonsäuren: die der Citronensäure noch näher stehende *cis*-Aconitsäure wird einwandfrei rascher oxydiert als die natürliche Isocitronensäure¹⁾, die doch nach Martius Primärsubstrat der Dehydrierung sein sollte. Die einfachste Erklärung hierfür dürfte wohl die sein, daß *beide* Säuren über Citronensäure abgebaut werden und daß die einfache Rückhydratisierung der Aconitsäure rascher verläuft als die — vielleicht enzymatisch komplexere — Isomerisierung der Isocitronensäure zu Citronensäure.

Was die unterlegene Umsatzgeschwindigkeit der *racemischen* gegenüber der *natürlichen* (—) Isocitronensäure anbetrifft, so läßt sich aus unseren bei stets gleicher *molarer* Konzentration durchgeführten Versuchen nicht entscheiden, ob im ersteren Falle lediglich die auf die Hälfte *verminderte Konzentration* an dem — vielleicht von den Bakterien ausschließlich umgesetzten — natürlichen Antipoden maßgebend ist oder aber ob ein wahrer *Hemmungseffekt* des anderen Antipoden vorliegt, wie er z. B. beim Äpfelsäureumsatz durch Hefe-Aerogenes von Wieland u. Mitarbeitern (a. a. O., S. 113) festgestellt worden ist. Selbst wenn — was wahrscheinlich ist — das Letztere der Fall wäre, würden hiervon doch die früheren *anaeroben* Versuche Deffners mit *racemischer* Isocitronensäure (a. a. O., S. 85), bei denen ein im Vergleich zu Citronensäure nur sehr geringfügiger Umsatz zu verzeichnen war, in keinem wesentlichen Punkte betroffen werden. Die von Martius in seiner 2. Mitteilung (1938) anhangsweise ausgesprochene Vermutung, daß der Mißerfolg Deffners mit Isocitronensäure auf die Verwendung *racemischer* Säure zurückgehe,

¹⁾ Für die liebenswürdige Überlassung von etwa 200 mg optisch aktiver Isocitronensäure danken wir Herrn Doz. Dr. habil. C. Martius bestens.

wird jedenfalls durch die nunmehr experimentell bewiesene Tatsache widerlegt, daß auch die *natürliche*, optisch aktive Verbindung von Bakterien immer noch erheblich langsamer angegriffen wird als Citronensäure.

Wir halten es für keinen Zufall, daß bei beiden untersuchten Bakterienspezies das äquimolekulare Gemisch von *Oxalessigsäure* + *Essigsäure* — trotz stark variierender Reaktionsgeschwindigkeit der Komponenten — gleich rasch oxydiert wird wie *Citronensäure*. Die Identität des Verhaltens beider Systeme, auf die schon bei den *anaeroben* Versuchen zu wiederholten Malen hingewiesen worden ist und die wir als das vielleicht beweiskräftigste Argument zugunsten unseres Abbauschemas betrachten, findet so auch auf dem Gebiet des *aeroben* Citratabbaus weitere Bestätigung. Nichts spricht zum mindesten dagegen — und hier tritt erneut die Analogie zum desmolytischen *Kohlehydratabbau* zutage —, daß die *Verbrennung* ebenso wie die *Vergärung* der Citronensäure durch die Bakterienzelle über jene primäre „Desaldolisierung“ erfolgt.

Der eine von uns (M. D.) dankt der Universität Athen für das ihm gewährte Stipendium aus der Voltos-Stiftung.

Nachschrift: Nach Fertigstellung dieser Untersuchung erschien in der „Enzymologia“ 6, 273 (1939) eine Arbeit von C. R. Brewer u. Werkman über „The anaerobic dissimilation of citric acid by *Aerobacter indologenes*“, in der das von Deffner bereits vor einem Jahr [A. 586, 44 (1938)] entwickelte und in der vorliegenden Veröffentlichung von uns in seiner allgemeinen Gültigkeit für den bakteriellen Citratabbau erkannte Schema in allen wesentlichen Punkten übernommen wird, ohne daß diese Tatsache in der Arbeit der genannten Autoren — bei der Fülle sonstiger zitierter Literatur — hinreichend zum Ausdruck käme. Die kurze vorläufige Mitteilung von Brewer u. Werkman [J. Bact. 36, 657 (1938)], auf die sich die Verfasser beziehen und mit der „die Ergebnisse Deffners in mehrfacher Hinsicht Übereinstimmung zeigen“ sollen, enthält lediglich die Angabe, daß die Hauptprodukte der Citronensäure-*vergärung* durch *Aerobacter indologenes* Ameisensäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, CO₂ und H₂ sind, wozu noch kleine Mengen von Acetyl-methylcarbinol, 2,3-Butylenglykol, Äthylalkohol und Milchsäure kommen; ferner daß der bakterielle Citratabbau durch verschiedene Enzymgifte wie Arsenit, Bisulfit, Jodacetat und NaF aerob und anaerob in wechselndem Ausmaß hemmbar ist; schließlich daß der „Citronensäure-cyclus“ von Krebs u. Johnson [Enzymol. 4, 148 (1937)] — der im Prinzip den Abbau über α -Ketoglutarsäure, den Wiederaufbau über Oxalessigsäure annimmt — für den bakteriellen Dissimilationsvorgang keine Gültigkeit besitzt. Von der Schlüssel-

stellung der *Oxalessigsäure* beim Citratabbau durch Bakterien enthält diese kaum $\frac{1}{2}$ Seite umfassende Mitteilung indes kein Wort. In der soeben erschienenen ausführlichen Veröffentlichung finden sich sehr sorgfältig ausgeführte und gut stimmende Bilanzen unter Berücksichtigung aller Nebenprodukte (die jedoch keineswegs für den *Citronensäure*-abbau durch *Aerogenes* charakteristisch sind, sondern sich — in teilweise erheblich größerer Menge — auch beim *Glucose*-abbau finden). Ferner wird der Einfluß der „Gewöhnung“ an einem Beispiel erläutert sowie eine Zusammenstellung der durch den Organismus vergärbaren und nichtvergärbaren Substrate gegeben; unter den ersteren findet sich keines, das nicht schon von Wieland und seiner Schule am Hefe-*Aerogenes* präparativ untersucht worden wäre, unter den letzteren merkwürdigerweise die Aconitsäure, wohl sicher wegen Verwendung des ungeeigneten *trans*-Isomeren, dessen Reaktionsträgheit schon vom tierischen Citratabbau her bekannt ist. Trotz interessanter Einzelheiten, welche die Arbeit der amerikanischen Autoren enthält, muß hier doch nochmals daran festgehalten werden, daß ihr Hauptergebnis, das mit dem unsrigen identische Abbauschema der Citronensäure, schon vor Jahresfrist von Deffner an einem — wie die Autoren richtig vermuten — mit ihrem *Aerobacter indologenes* nahe verwandten Mikroorganismus gewonnen und publiziert worden ist.

Zur Kenntnis der sog. Glucose-oxydase. II;

von *Wilhelm Franke* und *Michael Deffner*.

Mit 2 Figuren im Text.

(Eingelaufen am 22. August 1939.)

Vor rund 2 Jahren haben Franke und Lorenz¹⁾ die Glucose-oxydase der Schimmelpilze, deren Entdeckung und erste Beschreibung man D. Müller²⁾ verdankt, einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Das wesentlichste Ergebnis der Arbeit war gewesen, daß dieses Oxydationsenzym zwar nicht — wie Müller angenommen hatte — *ausschließlich*, aber doch sehr *bevorzugt* mit *Sauerstoff* reagiert, insofern als daneben nur chinoide Verbindungen hohen Redoxpotentials (wie Chinon und Indophenole) als H-Acceptoren zu fungieren

¹⁾ I. Mitt. A. 532, 1 (1937).

²⁾ Bio. Z. 199, 136 (1928); 205, 111 (1929); 213, 211 (1929); 232, 423 (1931); Erg. Enzymforsch. 5, 259 (1936).