

Mark, K. H. Meyer, de Boer und Hermans hervorzuheben. Namentlich der letztgenannte Forscher hat in seinen vielfach erwähnten Arbeiten den Versuch unternommen, das mechanische Verhalten unmittelbar an die Geometrie der Deformationsvorgänge anzuschließen. Die Darstellung dieser Zusammenhänge bedürfte aber eines eigenen Aufsatzes.

Unerwähnt sind auch zwei für feinbauliche Untersuchungen im festen Zustand höchst bedeutsame Methoden geblieben: die Elektronenbeugung und das Elektronenmikroskop. Wenn mit diesen Hilfsmitteln auch bisher auf unserem besonderen Gebiet noch keine entscheidenden Ergebnisse erzielt worden sind, so darf doch erwartet werden, daß ihnen in der Zukunft auch hier eine große Bedeutung zufällt. Die neueren Elektronenbeugungsversuche namentlich am Thieffenschen

Institut⁷⁰⁾, sowie die elektronenmikroskopischen Arbeiten aus dem gleichen Institut^{71,72)}, den Forschungsinstituten von Siemens & Halske⁷¹⁾, der AEG⁷²⁾, dem Hochspannungslaboratorium der Technischen Hochschule Berlin⁷³⁾ und dem Laboratorium M. v. Ardenne^{74, 75)} zeigen, welcher Stand der Technik in apparativer Hinsicht wie in der Anwendung auf Probleme des kolloiden Zustandes hier schon erreicht werden konnte.

⁷⁰⁾ Th. Schoon, diese Ztschr. 52, 245, 260 [1939]; Th. Schoon u. R. Haul, Z. physik. Chem. Abt. B. 44, 109 [1939].

⁷¹⁾ B. v. Borries u. E. Ruska, Naturwiss. 27, 281, 577 [1939]; H. Ruska, ebenda 27, 287 [1939]; G. A. Kausche, E. Pfankuch u. H. Ruska, ebenda 27, 292 [1939].

⁷²⁾ E. Brüche u. E. Haagen, ebenda 27, 809 [1939].

⁷³⁾ D. Beischer u. F. Krause, ebenda 25, 1 [1937]; D. Beischer, Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 44, 375 [1938]; D. Beischer u. F. Krause, diese Ztschr. 51, 331 [1938].

⁷⁴⁾ Naturwiss. 28, 113 [1940]; Z. Physik 108, 338 [1938]; 112, 744 [1939]; 114, 379 [1939].

⁷⁵⁾ M. v. Ardenne u. D. Beischer, diese Ztschr. 53, 103 [1940]; Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 46, 270 [1940]. Eingeg. 22. Dezember 1939. [A. 9.]

Zur Isolierung von Bakteriendehydrasen

Von Dozent Dr. WILHELM FRANKE und BASUDEV BANERJEE,

Chem. Laboratorium der Bayrischen Akademie der Wissenschaften, München

I. Übersicht.

Während über Gärungs- und Oxydationsleistungen zellfreier Säfte und Extrakte aus Hefe und teilweise auch Schimmelpilzen eine umfangreiche Literatur vorliegt, sind die Schrifttumsangaben über isolierbare Desmolasen von Bakterien ziemlich vereinzelt und unsystematisch.

Ein früher Versuch Buchners (1906), das bei der Hefezymase bewährte Preßsaftverfahren auch auf das glykolytische Ferment der Milchsäurebakterien¹⁾ sowie auf das alkoholsäuernde Prinzip der Essigbakterien²⁾ anzuwenden, führte nicht zum Erfolg. Erst mehr als 20 Jahre später glückte Stephenson³⁾ auf dem Wege der Autolyse die erstmalige einwandfreie Abtrennung eines bakteriellen Oxydationsferments, der Lactico-dehydrase des B. coli, von der Zellstruktur, ein Ergebnis, das sich später auch bei anderen Bakterien (z. B. Gonokokken⁴⁾) realisieren ließ. 1929 konnte Stickland⁵⁾ die Formico-dehydrase aus B. coli auf Grund ihrer erheblichen Beständigkeit gegen langdauernde Einwirkung von Verdauungsenzymen + Fluorid von den übrigen Zelldeshydrasen abtrennen und in zellfreie, doch stark zelltrümmertartige „Lösung“ überführen. Gale⁶⁾ hat 1939 die Befunde Sticklands an Zelltrümmersuspensionen des gleichen Organismus, die in der naßmahlenden Bakterienmühle von Booth u. Green⁷⁾ erhalten worden waren, bestätigt und erweitert. Nach demselben Verfahren hat dieser Autor kürzlich, zusammen mit Stephenson⁸⁾, die Isolierung einer löslichen, coenzymabhängigen Malico-dehydrase aus B. coli durchgeführt. Nimmt man noch den Befund der v. Eulerschen Schule⁹⁾, daß im Extrakt wiederholt gefrorener Colibakterien eine — durch Codehydrase II zu voller Aktivität ergänzbare — Glutaminsäure-dehydrase nachweisbar ist, und die Angabe Yamaguchi¹⁰⁾, wonach Berkefeld-Filtrate kurze Zeit autolytischer Suspensionen von B. pyocyaneum eine wirksame Indophenol-oxydase enthalten sollen, hinzu, so dürften die wesentlichen Arbeiten über die Isolierung von Bakterien-desmolasen ziemlich vollständig zitiert sein.

II. Untersuchungen an „Friersäften“.

Von den bisher zur Enzymfreilegung aus Bakterien in Anwendung gekommenen drei Methoden, der Autolyse, dem Zermahlen der Zellen in Spezialmühlen und der Strukturzerstörung durch wiederholtes Frieren und Auftauen, haben wir zunächst die letztere eingehender geprüft, da sie aller Voraussicht nach ein ziemlich „schonendes“ Verfahren darstellte, das — von dem oben erwähnten, bereits in den Zeitraum der vorliegenden Untersuchung fallenden Einzelbefund an einem Bakterium abgesehen — schon vor mehr als 25 Jahren¹¹⁾ und in neuester Zeit wieder in den Händen von Lynen¹²⁾ bei Hefe zu ermunternden Erfolgen geführt hat.

14 verschiedene, den Familien der Coccaceen, Bacteriaceen, Bacillaceen und Spirillaceen angehörige Bakterienarten wurden auf Bouillonagar gezüchtet, das Zellmaterial geerntet, wiederholt gewaschen und nach dem Abzentrifugieren 5mal in flüssiger Luft gefroren und wieder aufgetaut, wobei meist Verflüssigung eintrat.

Nach dem Verdünnen mit einem dem Feuchtgewicht der eingesetzten Bakterienmenge ungefähr entsprechenden Volumen Phosphatpuffer (pH 7,5) und 12stündigem Stehenlassen wurde zentrifugiert und der gewonnene, praktisch klare und zellfreie, meist schwach gelb gefärbte „Friersaft“ im Methylblauversuch nach Thunberg auf sein Dehydrierungsvermögen gegenüber organischen Säuren untersucht. Da Vorversuche an verschiedenen Arten intakter („ruhender“) Bakterien ergeben hatten, daß sich nach der Methylblau-technik — im Gegensatz zur aeroben Methodik¹³⁾ — mit einiger Regelmäßigkeit und in größerer Aktivität nur die Dehydrasen der Milchsäure, Bernsteinsäure und allenfalls Ameisensäure nachweisen lassen (wozu in einigen Fällen noch Äpfelsäure, Brenztraubensäure, Glutaminsäure und vielleicht einige andere kommen), wurde zur Orientierung in den Friersaftversuchen nur auf die Donatoraktivität der erstgenannten drei Säuren systematisch geprüft.

Das erste Versuchsergebnis war, daß die zellfreien Friersäfte Lactico-, Succino- und Formico-dehydrase in wechselnder Aktivität, je nach der Bakterienart, enthalten. Meist ist die Wirksamkeit der drei Dehydrierungsfermente in der angegebenen Reihenfolge abgestuft, u. a. auch in B. coli, dessen Friersäfte unter sämtlichen untersuchten Bakterien-spezies die beste Durchschnittsaktivität aufwiesen; in anderen Fällen kann nur eine Dehydrase in größerer Menge isoliert werden, z. B. Lactico-dehydrase aus Sarcina lutea, Succino-dehydrase aus Bac. megatherium.

a) Um ein ungefähres Bild der im einzelnen erheblichen quantitativen Unterschiede zu geben, seien in der folgenden Tabelle die auf ein Durchschnittstrockengewicht der Friersäfte von 10 mg/cm³ korrigierten Entfärbungszeiten t im „Normalansatz“ (Gesamt-volumen 4,0 cm³, T = 37,5°)

1,0 cm³ Friersaft 0,5 cm³ m/5-Phosphatpuffer pH 7,5
1,0 cm³ m/10-Substratlösung 0,5 cm³ Methylblau 1:5000 (~ m/2000)
für 5 verschiedene Bakterienarten angegeben:

Donator	t (min.)				
	Microc. aureus	Sarc. lutea	B. coli	B. vulgare	Bac. megatherium
—	>360	>360	>360	>360	>360
Formiat	>360	>360	120	62	>360
Lactat	11,5	8,5	5,5	33	>360
Succinat	22	210	21	72	11

Ergänzt man die Friersäfte durch Codehydrasezusatz, so lassen sich in ihnen weitere Dehydrasen nachweisen, u. a. die der Glutaminsäure, Äpfelsäure und Glucose.

b) Verwendet wurde ein codehydrase-II-haltiges Cozymasepräparat (nach v. Euler, Albers u. Schenk¹⁴⁾). Die Ansätze mit Milch- und Äpfelsäure erhielten außerdem einen Zusatz von m/30-Semicarbazid zur Bindung der durch Dehydrierung gebildeten, hemmend wirkenden Ketonsäuren¹⁵⁾. In einem bis auf das erlöhte Gesamtvolumen von 6 cm³ dem obigen „Normalansatz“ entsprechenden Versuch mit Coli-Friersaft wurden z. B. die folgenden Entfärbungszeiten gemessen (in Minuten):

ohne Donator	150	mit Succinat	33
mit Lactat	4,5	mit Glucose	55
mit Glutamat	7,5	mit Formiat	83
mit Malat	25		

¹⁰⁾ W. Franke u. Peris, Biochem. Z. 295, 61 [1937].

¹¹⁾ H. v. Euler, Albers u. Schenk, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 240, 113 [1936].

¹²⁾ Vgl. D. E. Green u. Mitarb., Biochemical J. 30, 1489, 2095 [1936]; 31, 865 [1937].

¹⁾ E. Buchner u. Meisenheimer, Liebigs Ann. Chem. 349, 125 [1906].

²⁾ E. Buchner u. Gault, ebenda 349, 140 [1906].

³⁾ M. Stephenson, Biochemical J. 22, 605 [1928].

⁴⁾ E. S. G. Barron u. Hastings, J. biol. Chemistry 100, 155 [1933].

⁵⁾ L. H. Stickland, Biochemical J. 23, 1187 [1929].

⁶⁾ E. F. Gale, ebenda 33, 1012 [1939].

⁷⁾ V. H. Booth u. Green, ebenda 33, 855 [1938].

⁸⁾ E. F. Gale u. Stephenson, ebenda 33, 1245 [1939].

⁹⁾ E. Adler, Hellström, Günther u. v. Euler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 255, 14 [1938].

¹⁰⁾ S. Yamaguchi, Acta phytochem. 10, 171 [1937].

¹¹⁾ H. H. Dixon u. Atkins, Proc. Roy. Soc. Dublin 14, 1 [1913].

¹²⁾ F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 539, 1 [1939].

Bei diesen Versuchen wurde gleichzeitig die Beobachtung gemacht, daß die Lactico-dehydrase der Bakterien (genau wie die Formico-¹⁶⁾ und die Succino-dehydrase) im Gegensatz zu Angaben Yudkins¹⁷⁾ keines dialysablen Co-Ferments bedarf; dies unterscheidet sie vom tierischen Enzym und stellt sie an die Seite des Hefeferments¹⁸⁾.

III. Untersuchungen an Autolysaten gefrorener Bakterien.

Wenn sich auch die Friersaftherstellung grundsätzlich zur Isolierung von Bakteriendehydrasen geeignet erwiesen hat, so stellt sie doch ein sehr verlustreiches Verfahren dar; selbst von der gut löslichen (s. später) Lactico-dehydrase gehen nur einige wenige Prozent der ursprünglich in den Zellen vorhandenen Enzymmenge in Lösung. (Indes ist zu bedenken, daß auch das Buchnersche Preßsaftverfahren bei Pilzen nur Ausbeuten von einigen Prozent liefert¹⁹⁾). Es wurden daher die zentrifugierten Zellrückstände der Friersaftdarstellung bei pH 7,5 und 37° einer 10—20tägigen Autolyse (ohne weitere Zusätze) unterworfen. Alle Dehydrasen, auf die in den Friersäften mit Erfolg geprüft worden war, fanden sich auch in den zentrifugierten zellfreien Autolysaten, doch mit einer — von Succino- und Glutamino-dehydrase abgesehen — höheren spezifischen Aktivität (= Aktivität/Trockengewicht) als in den Friersäften.

a) So wurden in einem dem Versuch IIb vollkommen entsprechenden Ansatz mit 1 cm³ Coli-Autolysat (= 10 mg Tr.-Gew.) folgende Entfärbungszeiten (in Minuten) beobachtet:

ohne Donator	100	mit Succinat	53
mit Lactat	1,5	mit Glucose	28
mit Glutaminat	13,5	mit Formiat	28
mit Malat	8		

¹⁶⁾ E. F. Gale, ebenda **33**, 1012 [1930].

¹⁷⁾ J. Yudkin, ebenda **31**, 865 [1937].

¹⁸⁾ E. u. M. E. Boyland, ebenda **23**, 1417 [1934]; E. Adler u. Michaelis, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **235**, 154 [1935].

¹⁹⁾ Vgl. z. B. A. Harden: Alcoholic fermentation, S. 30 [London 1923]; W. Franke u. Deffner, Liebigs Ann. Chem. **541**, 117 [1939].

Vor allem war die Enzymsausbeute wegen des gleichzeitig mehrfach höheren Trockengewichts der Autolysate durchweg wesentlich besser als in den Friersäften; rd. ein Viertel der Ausgangsmenge an Lactico-dehydrase, ein Siebtel derjenigen von Formico-dehydrase (doch nur wenige Prozent der in der Zelle vorhandenen Succino-dehydrase, die — ebenso wie die Glutamino-dehydrase — während der Autolyse offenbar eine Schädigung erfährt), wurden in den Autolyselösungen wiedergefunden.

Die Autolyse intakter Bakterien wies gegenüber derjenigen gefrorener Zellen verschiedene Nachteile auf (z. B. große Zähflüssigkeit und dementsprechend schwere Zentrifugierbarkeit der Autolysate) und ließ nicht die mit letzteren erzielten guten Ausbeuten erreichen.

IV. Lösungszustand der isolierten Dehydrasen.

Nach Filtration der auf die eine oder andere Art gewonnenen Enzymlösungen durch bakteriendichte Filter (1 μ Porenweite) findet man die Formico-dehydrase nicht mehr, die Lactico-dehydrase vollständig, die übrigen Dehydrasen teilweise (zu $\frac{2}{5}$ — $\frac{2}{3}$) im Filtrat wieder. Mit Ausnahme der Formico-dehydrase, für die schon Stickland²⁰⁾ u. Gale²¹⁾ zu gleichen Befunden gelangt waren, handelt es sich bei den isolierten Bakteriendehydrasen also um grundsätzlich „lösliche“ Enzyme (in dem in der Enzymchemie gebräuchlichen Sinne).

Dieses Ergebnis ist überraschend für die erstmals aus Bakterien isolierte Succino-dehydrase, da ein analoger Filtrationsversuch an einer aus Pferdeherz (nach Thunberg²²⁾) dargestellten Succinodehydraselösung einen rd. 90%igen Aktivitätsverlust ergab.

Nach den vorliegenden Ergebnissen, über die an anderer Stelle ausführlicher berichtet wird²³⁾, scheinen sich die beiden Verfahren der Friersaft- und Autolysatherstellung aus gefrorenen Zellen allgemein für die Isolierung von Desmolasen aus Bakterien (und wohl auch anderen Mikroorganismen) zu eignen und sollen in dieser Richtung weiter geprüft und ausgebaut werden.

Eingeg. 15. März 1940. [A. 30.]

²⁰⁾ T. Thunberg bei Oppenheimer-Pincussen: Die Methodik d. Fermente, S. 112b [Leipzig 1929].

²¹⁾ W. Franke u. B. Banerjee, Biochem. Z. im Druck.

Über die Verhefung der Pentosen*)

Von Dr.-Ing. habil. RICHARD LECHNER,

Institut für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Berlin

Unter den Kohlenhydraten nehmen die Pentosen, die Zucker mit 5 Kohlenstoffatomen, einen untergeordneten Platz ein. Sie gelten als unvergärbare und sind damit gärungschemisch gegenüber den Hexosen als Kohlenhydrate zweiten Ranges gekennzeichnet. Auch ihre Ausnützung im tierischen Organismus ist schlechter als die der Hexosen. Die Pentosen sind in der Natur weit verbreitet. Sie kommen meist in polymerer Form als Pentosane vor und sind vornehmlich am Aufbau der Hemicellulosen beteiligt. Vor allem weisen Holz und Stroh und die Samen und Schalen vieler Pflanzen einen beträchtlichen Pentosengehalt auf. So enthält Fichtenholz oder Kiefernholz durchschnittlich 12—13%, Buchenholz sogar 28—30% Pentosane. Die Angaben über die Pentosangehalte der Hölzer schwanken und sind nicht einheitlich. Der auffallende Unterschied im Pentosangehalt von Nadel- und Laubholz beruht auf der grundverschiedenen Zusammensetzung des Hemicellulosenanteils der beiden Holzarten. Die größte Bedeutung unter den Pentosen hat die d-Xylose, die im Holz fast ausschließlich vorkommt. Von geringerem Interesse sind die l-Arabinose, die Methylpentose Rhamnose und die mit den Pentosen in enger Beziehung stehenden Hexuronsäuren.

Bei der chemischen Verarbeitung des Holzes zur Zellstoff- und Papierherstellung und bei der Hydrolyse des Holzes mit Säuren finden sich in den Sulfitablaugen und Holzzuckerlösungen die Pentosen mehr oder minder vollständig und unersetzt wieder. Der Verwertung der Pentosen kommt vom Standpunkt der Rohstoffausnutzung und in wirtschaftlicher Hinsicht eine gewisse Bedeutung zu. Infolge der zunehmenden chemischen Verarbeitung von Holz auf Papier und Zellstoff

kann der Rohstoffbedarf in Verbindung mit der deutschen Eigenversorgung nicht mehr wie früher ausschließlich durch Nadelholz gedeckt werden, sondern es muß auch auf das sehr pentosanreiche Laubholz, insbes. Buchenholz, zurückgegriffen werden. Die teilweise Umstellung der Zellstoffindustrie auf den Rohstoff Buchenholz hat einen vermehrten Anfall sehr pentosenreicher Abflaugen zur Folge. Die Verwertung der Buchenholzsulfitablaugen stellt die Zellstoffindustrie vor neue Aufgaben. Die Ausnutzung des Kohlenhydratanteils der Buchenholzsulfitablaugen ist ein Problem der Pentosenverwertung geworden. Da die Konzentration der Pentosen in Holzzuckerlösungen und Sulfitablaugen verhältnismäßig gering ist und eine Reihe teils bekannter, teils undefinierter Begleitstoffe zugegen ist, ist die chemische Verarbeitung der Pentosen zu Furfural oder die Gewinnung der Pentosen in fester oder reiner Form als Futtermittel, Diabetikernahrung usw., abgesehen von der Wirtschaftlichkeit, mit Schwierigkeiten verbunden. Die gärungschemische Verwertung der Pentosen ist dadurch in den Vordergrund gerückt und zum Teil bereits gelöst worden.

Bei der gärungschemischen Verwertung von Zuckern oder anderen geeigneten Kohlenstoffverbindungen sind grundsätzlich zwei Wege zu unterscheiden. Erstens „Vergärung“ irgendwelcher Stoffe, d. h. ihre Aufspaltung in ein, zwei oder mehrere Gärungsprodukte, wie Alkohol, Kohlensäure, Essigsäure usw., mit Hilfe von Mikroorganismen, welche diesen Vorgang mit ihren Enzymsystemen unter geeigneten Bedingungen auslösen, also gewissermaßen katalysieren, und zweitens die „Zellsubstanzbildung“, indem die den Mikroorganismen dargebotenen Kohlenstoffverbindungen bei Nährsalz- und Luftzuführung zum Aufbau neuer Zellsubstanz

*) Nach einem für die 52. Hauptversammlung des VDOh in Salzburg vorgesehenen Vortrag.