

# DIE CHEMIE

(Angewandte Chemie, Neue Folge)

56. Jahrgang, Nr. 9/10, Seiten 55—66, 6. März 1943

## Neuere Erkenntnisse zum Stoffwechsel der Mikroorganismen<sup>\*)</sup>

Von Prof. Dr. WILHELM FRANKE

Institut f. organisch-chemische Technologie  
u. Gärungsschemie d. Universität Würzburg

### I. Allgemeines und Systematisches.

Die chemischen Leistungen der primitivsten einzelligen Organismen, der Bakterien und Pilze, zeigen eine Mannigfaltigkeit der Reaktionsformen und Stoffwechselprodukte, wie man sie weder bei den höheren Tieren noch Pflanzen auch nur annähernd wiederfindet. Schon und gerade in der niederen Klasse, derjenigen der Schizomyceten, Spaltpilze oder Bakterien, treten die denkbar größten Unterschiede im Stoffwechseltypus auf: Ein kleinerer Teil dieser Einzeller vermag, wie die grüne Pflanze, von  $\text{CO}_2$  ausgeliend seine Leibessubstanz aufzubauen, ist also autotroph, während die Mehrzahl zum Zellaufbau, ähnlich den chlorophyll-losen Pflanzen und den Tieren, schon vorgebildeter organischer Stoffe bedarf, demnach den heterotrophen Lebewesen zuzurechnen ist. Die schon etwas höher organisierten eigentlichen Pilze (Fungi) sind durchweg Heterotrophe; stoffwechselphysiologisch stehen die heterotrophen Bakterien ihnen ungleich näher als ihren autotrophen Klassengenossen. Diese Verhältnisse erschweren naturgemäß eine einheitliche phylogenetische Beurteilung der niederen einzelligen Lebewesen. M. Stephenson<sup>1)</sup> sagt hierüber treffend:

„Die Stellung der Bakterien in der Entwicklungsgeschichte ist eine sehr schwer zugängliche Frage; wir haben beispielsweise keine Vorstellung davon, ob die uns vertrauten Formen primitiven Bakterientypen ähneln, oder ob sie, wie die heutigen Tiere und Pflanzen, die erfolgreichen Konkurrenten vieler Generationen sind. Vielleicht kann man die Bakterien versuchsweise als biochemische Experimentatoren betrachten; dank ihrer relativ geringen Größe und ihrem raschen Wachstum müssen Variationen viel häufiger auftreten als bei differenzierteren Formen des Lebens; dazu können sie es sich noch leisten, exponiertere Stellungen im Haushalt der Natur einzunehmen als größere Organismen mit höheren Bedürfnissen.“

Sehen wir von dieser Sonderstellung wenigstens gewisser Untergruppen der Mikroorganismen einstweilen ab, so zeigen sich andererseits doch wieder erhebliche Analogien zum Stoffwechsel der höheren Tiere und Pflanzen, Analogien, die schon im Interesse vermehrter Kenntnis des letzteren ein eingehendes Studium des Stoffumsatzes der Kleinlebewesen durchaus wertvoll erscheinen lassen. Dazu kommen noch gewisse vorteilhafte sachliche und methodische Eigenheiten des Arbeitens mit Mikroben, worauf insbes. Kluyver<sup>2)</sup> hingewiesen hat:

„Das Studium des Bakterienstoffwechsels<sup>3)</sup> bietet zwei gewichtige Vorteile gegenüber denjenigen der Biochemie höherer Organismen, nämlich 1. daß wir Anfangs- und Endzustand des Systems, das einer chemischen Umwandlung unterliegt, klar definieren können, und 2. daß wir es mit einheitlichen katalytischen Agentien zu tun haben.“

So hat denn auch die physiologische Chemie der höheren Tier- und Pflanzenwelt dem Studium der Mikroorganismen viel zu verdanken. Die wenigstens grundsätzliche Aufklärung des verwickelten Chemismus der Muskelglykolyse<sup>4,5)</sup> wäre kaum so bald erfolgt, wenn nicht vor-

Inhalt I. Allgemeines und Systematisches. — II. Substrat- und Sauerstoff-Umsatz. 1. Methodisches. 2. Der Stoffumsatz. 3. Das Verhalten gegen Sauerstoff. — III. Synthetische Leistungen von Mikroorganismen. 1. Kohlenhydrat. 2. Aminosäuren und Eiweiß. 3. Fettsäuren und Fette. — IV. Abbaureaktionen von Mikroorganismen. 1. Brenztraubensäure. 2. Essigsäure. 3. Citronensäure. 4. Aminosäuren. — V. Schlußbemerkungen

und nebenher die Arbeiten über die alkoholische Hefegärung<sup>4)</sup> gelaufen wären; und wir wüßten heute ungleich weniger über den Mechanismus der Zellatmung im höheren Organismus, wenn nicht die Atmungsfermente und wasserstoffübertragenden Systeme in Hefe und Bakterien so viel leichter aufzufinden und z. T. daraus zu isolieren gewesen wären, als dies bei den komplexeren Zellen der höheren Lebewesen oft der Fall war.

All diese Umstände — von der praktischen Seite des Problems, von der im Schlusskapitel noch die Rede sein wird, ganz abgesehen — rechtfertigen wohl eine im wesentlichen für den Chemiker bestimmte, kurze zusammenfassende Darstellung einiger neuerer Erkenntnisse auf dem Gebiete des Mikrobenstoffwechsels<sup>6)</sup>.

Über die systematische Stellung der Bakterien und Pilze unterrichten Tab. I und I a, in denen außer den durch Druck her-

Tabelle 1.

### Stellung der Bakterien und Pilze im Pflanzenreich.

Thallophyten (Thallus- oder Lagerpflanzen)				
Algen	Fungi (Pilze)	Myxomyeten (Schleimpilze)	Schizomyeten (Bakterien)	
— Flechten —				
<b>Phycomyceten</b> (Algenpilze)				
Oomyceten (Eipilze)	Zygomyceten (Brückenpilze)	Ascomyceten (Schlauchpilze)	Basidiomyceten (Basidienpilze)	Eumyceten (höhere Pilze)
Saprolegnia	Mucor Rhizopus	Saccharomyces (Hefe) Endomyces	Aspergillus Penicillium	Torula Oidium Monilia Cladosporium

Tabelle 1a.

### System der Bakterien.

Schizomyeten (Spaltpilze, Bakterien)				
Eubakterien (Einzeller)	Mycobakterien (pilzartige Bakterien)	Trichobakterien (Fadenbakterien)	Myxobakterien (Schleimbakterien)	Spirochäten
	<i>Mycobacterium</i> (z. B. tuberculosis, leprae u. a.)	<i>Bacterium</i> (z. B. coli, pyocyaneum, faecis aerogenes, typhosum u. a.)	<i>Bacillus</i> (z. B. mesentericus, subtilis, anthracis u. a.)	<i>Vibrio</i> (z. B. cholerae)
	<i>Corynebacterium</i> (z. B. diphtheriae)	Milchsäurebakterien	Aerobe u. fakultativ Anaerobe	<i>Spirillum</i>
	<i>Actinomyces</i> (z. B. bovis)	Essigsäurebakterien (Acetobacter)	<i>Clostridium</i> (z. B. tetani, botulinum, histolyticum u. a.)	
		Propionsäurebakterien	Anaerobe), Buttersäure- bakterien, Cellulose- und Pektin-Vergärtner	
		Azotobacter		
		Nitrobacter		
<b>Coccaceen</b> (Kugelbakt.)	<b>Bacteriaceen</b> (Stäbchenbakt.)	<b>Bacillaceen</b> (sporetragende Stäbchenbakt.)	<b>Spirillaceen</b> (Schraubenbakt.)	
<i>Streptococcus</i> (z. B. lactis, Pneumococcus)	<i>Bacterium</i> (z. B. coli, pyocyaneum, faecis aerogenes, typhosum u. a.)	<i>Bacillus</i> (z. B. mesentericus, subtilis, anthracis u. a.)	<i>Vibrio</i> (z. B. cholerae)	
<i>Micrococcus</i> (z. B. aureus, Gemmococcus)	Milchsäurebakterien	Aerobe u. fakultativ Anaerobe	<i>Spirillum</i>	
<i>Sarcina</i> (z. B. faecalis)	Essigsäurebakterien (Acetobacter)	<i>Clostridium</i> (z. B. tetani, botulinum, histolyticum u. a.)		
	Propionsäurebakterien	Anaerobe), Buttersäure- bakterien, Cellulose- und Pektin-Vergärtner		
	Azotobacter			
	Nitrobacter			

vorgehobenen Familien, Ordnungen usw. auch einige z. T. später im Text erwähnte Gattungen und Arten verzeichnet sind. In der auch heute noch teilweise umstrittenen Bakteriensystematik wurde der Nomenklatur Lehmann-Neumanns<sup>7)</sup> zumeist der Vorzug gegeben.

<sup>1)</sup> Ausführlicher Bericht von W. Franke u. R. Sonderhoff: Biochemie d. Bakterien und Pilze, bei B. Flaschenrührer: Lehrb. d. physiol. Chemie (Berlin, im Druck).

<sup>2)</sup> Bakteriolog. Diagnostik (München 1926/27).

<sup>3)</sup> Nach einem Vortrag am 19. Juni 1942 auf der Mitteldeutschen Vortragsveranstaltung des VDCh in Kassel.

<sup>4)</sup> Bacterial metabolism (London, 1. Aufl. 1930, 2. Aufl. 1939).

<sup>5)</sup> The chemical activities of micro-organisms (London 1931).

<sup>6)</sup> Über eine analoge Untersuchungsmethodik des Hefe- und Schimmelpilzpflanzestoffs vgl. R. Sonderhoff, Ergebn. Enzymforsch. 3, 163 [1934], und A. J. Kluyver u. P. J. Pernas, Biochem. Z. 266, 68 [1933].

<sup>7)</sup> Vgl. z. B. O. Meyerhof, Ergebn. Enzymforsch. 4, 208 [1935].

<sup>8)</sup> J. A. Pernas, ebenda 5, 57 [1937].

## II. Substrat- und Sauerstoff-Umsatz.

Wie bei jeder Zelle, so besteht auch bei der Bakterien- und Pilzzelle die Lebenstätigkeit in einem dauernden Stoffaufbau (Assimilation, Synthese) und Stoffabbau (Dissimilation). Während der Abbau die Energie für die verschiedenen Leistungen der lebenden Zelle und teilweise auch das Ausgangsmaterial für den Um- und Neuaufbau von Zellsubstanzen liefert, hat der Stoffaufbau den Ersatz von Zellbestandteilen, die der Abnutzung und dem Abbau verfallen, sowie die Bildung neuer lebender Zellen, d.h. Vermehrung und Wachstum, zu besorgen. Im allg. deckt dabei die energiespendende Dissimilation den Aufwand der energieverbrauchenden Assimilation.

### 1. Methodisches.

Eine zum Studium des Chemismus notwendige reinliche Scheidung der in vivo häufig gekoppelten Auf- und Abbauvorgänge ist naturgemäß schwierig, insbes. bei der lange Zeit ausschließlich geübten Methode der Stoffwechselversuche bzw. der Züchtung von Organismen auf Nährböden bestimmter Zusammensetzung. Oftmals werden hier Produkte gefaßt, die über eine ganze Reihe (u. U. auch synthetischer) Zwischenstufen entstanden sind und deren Beziehung zum Ausgangsstoff nicht mehr mit Sicherheit zu erkennen ist. Mehr und mehr bemüht man sich daher heute, zum wenigsten die biologischen Abbaureaktionen einigermaßen rein herauszuschälen durch Verwendung sog. „ruhender“, d. h. im Zustande der Nichtfortpflanzung befindlicher Mikroorganismen. Nach Quastel<sup>8)</sup>, der diese Methode der „resting bacteria“ 1924 als erster in die biochemische Praxis eingeführt hat, sind kurze Versuchsdauer, Abwesenheit einer Stickstoff-Quelle, Ausschluß von Sauerstoff sowie das Arbeiten bei relativ hoher Temperatur die wichtigsten Voraussetzungen für die Ausschaltung des Aufbaustoffwechsels von Bakterien; diese sollen dann — in Form substratfrei gewaschener Suspensionen — im wesentlichen nur mehr als Enzymmaterial zum Abbau zugesetzter Substrate dienen wie sonst etwa Extrakte aus tierischen und pflanzlichen Geweben. Hierher gehören auch die neueren Untersuchungen Wielands und seiner Schule<sup>9)</sup> an „verarmter“, d. h. durch mehrstündiges Vorschütteln unter Sauerstoff ihrer Inhaltsstoffe weitgehend beraubter Hefe und die von Kluyver<sup>10)</sup> empfohlene Verwendung feinstverteilten, unter intensiver Durchlüftung entstandenen gewaschenen Schimmelpilzmyzels.

Der von Quastel geforderte Sauerstoff-Ausschluß bei den eigentlichen Abbauversuchen läßt sich aus physiologischen und anderen Gründen oft nicht verwirklichen, da ein Stoffabbau unter diesen Bedingungen häufig ausbleibt oder nur durch Zugabe zellfremder Wasserstoff-Acceptoren (z. B. Chinon oder Methylenblau) erzwungen werden kann. Unter aeroben Bedingungen muß man — was selbst in der neueren Literatur des öfteren übersiehen worden ist — auch bei Abwesenheit einer Stickstoff-Quelle immer mit synthetischen Zelleistungen rechnen, wofür später noch Belege gebracht werden (Abschn. IV, 2).

### 2. Der Stoffumsatz

der Kleinlebewesen ist dadurch gekennzeichnet, daß er in den meisten Fällen, insbes. bei den sog. Gärungserregern, einen ungleich größeren Umfang annimmt, als wir ihn bei den höheren Organismen gewohnt sind.

So weiß man schon seit 50 Jahren, daß Hefe je Stunde ihr Eigenwert an Zucker zu vergären vermag, wobei nur 0,5—5% des vergorenen Substrats als neugebildete Zellsubstanz erscheinen. Weitere Beispiele für die Größenordnung anaerober Spaltungsvorgänge sind die Zersetzung von Harnstoff (in CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub>) durch *Micrococcus ureae*, der je Stunde das 180—1200fache seines Eigenwerts (feucht) an Harnstoff abbaut und die Vergärung von Lactose durch *Bact. acidi lactici*, bei der stündliche Spaltungsumsätze vom 180—15 000fachen des (feuchten) Bakteriengewichts beobachtet wurden (zitiert nach Stephenson<sup>11)</sup> 1930).

Dieser auffallend hohe Umsatz insbes. bei sauerstoff-los verlaufenden Spaltungen ist durch deren relativ geringe energetische Ergiebigkeit bedingt, der die Organismen durch Erhöhung der Menge an umgesetztem Substrat zu begegnen suchen.

Tab. 2 enthält eine Gegenüberstellung von Änderungen der Gesamtenergie II (= Wärmetonungen) und der freien Energie F bei der Veratmung und verschiedenen Vergärungsformen des Zuckermoleküls, ausgedrückt in kcal je Mol.

<sup>8)</sup> Vgl. J. H. Quastel bei Oppenheimer-Pincussen: D. Methodik d. Fermente, S. 1154 (Leipzig 1929).

Tabelle 2<sup>9,10)</sup>.  
Energieumsätze bei Atmung und Gärung.

Reaktion	-F	-H
Glucose + 6O <sub>2</sub> = 6CO <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	685,0	674,0
Glucose = 2Milchsäure	32,8	29,0
Glucose = 2Äthylalkohol + 2CO <sub>2</sub>	55,3	20,6
Glucose = Acetaldehyd + Glycerin + CO <sub>2</sub>	22,8	-2,0
Glucose + 1/2H <sub>2</sub> O = 1/2Äthylalkohol + 1/2Essigsäure + Glycerin + CO <sub>2</sub>	30,8	9,1
Glucose = Butylalkohol + 2CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	69,4	33,8
Glucose = Buttersäure + 2CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub>	65,1	12,4
Glucose + H <sub>2</sub> O = Aceton + 3CO <sub>2</sub> + 4H <sub>2</sub>	45,1	-27,5

Dem nach werden bei der Vergärung von Zucker auch im günstigsten Falle nur etwa 10%, meist aber erheblich weniger, der frei umwandelbaren Energie gewonnen, welche die Verbrennung liefert; noch viel ungünstiger würde das Verhältnis bei einem Vergleich der Wärmetonungen ausfallen.

### 3. Das Verhalten gegen Sauerstoff

ist bei Mikroorganismen je nach Art außerordentlich verschieden. Es gibt Bakterien und Pilze, bei denen ein Wachstum ohne freien Sauerstoff nicht möglich ist, „obligat Aerobe“ wie Azotobacter, Nitrobacter, Acetobacter, die Erreger des Milzbrands, der Cholera, der Tuberkulose u. a., ferner die meisten Schimmelpilze, wilde Hefen wie Torula u. dgl. Die große Mehrzahl der bekannten Bakterien, ferner Hefen und verschiedene Mucor-Arten vermögen indes sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Sauerstoff zu leben und sich zu vermehren („fakultativ Aerobe“ bzw. „Anaerobe“).

Dabei übertrifft die Atmungsgröße aerober Mikroorganismen — ausgedrückt durch den Quotienten

$$\text{Q}_0 = \frac{\text{mm}^3 \text{O}_2\text{-Verbrauch}}{\text{mg Zelltrockengew.} \times \text{Std.}}$$

diejenige höher organisierter Zellen und Gewebe teilweise wieder erheblich, wofür Tab. 3 einige Belege gibt<sup>10a)</sup>.

Tabelle 3<sup>11)</sup>.

### Atmungsgrößen von Mikroorganismen und höheren Zellen.

Zellen bzw. Gewebe von	Temp. °C	Q <sub>0</sub>
Azotobacter (1½ Tage alt)	28	2000
Azotobacter (2½ Tage alt)	28	1400
Azotobacter (3½ Tage alt)	28	730
Acetobacter (Essigbakterien)	38	1000
Bac. mesentericus (Kartoffelbacillus)	38	40—65
Milchsäurebakterien	38	12—20
Aspergillus niger (2 Tage alt)		75
Aspergillus niger (3 Tage alt)		29
Aspergillus niger (4 Tage alt)		12
Bäckerhefe	20—28	48—108
Torula utilis (14 h alt)	20	71
Torula utilis (40 h alt)	20	37
Niere verschiedener Säugetiere	37,5	10—36
Leber verschiedener Säugetiere	37,5	6—20
Zwerchfell der Ratte	37,5	6—10
Leukozyten von Warmblütern	37,5	3,5—9
Erythrocyten von Warmblütern	37,5	0,6—1,5
Keimende Samen verschiedener Phanerogamen	16	2,4—5,1
Wurzeln verschiedener Phanerogamen	15—19	0,8—3,5
Blätter verschiedener Phanerogamen	16—21	0,5—1,1

Den Aeroben gegenüber steht eine große Gruppe von Bakterien, die ganz ohne Sauerstoff gedeihen, ja von diesem u. U. sogar stark geschädigt werden. [Für Pilze scheint nur eine auf *Saprolegnia* bezügliche ältere Angabe (Dop 1905) vorzuliegen.] Die wichtigsten Vertreter dieser „obligat Anaeroben“ finden sich unter den sporenbildenden Bacillen — dann häufig als Clostridien bezeichnet —, zu denen u. a. Gasbrand-, Rauschbrand-, Tetanus-Erreger, Cellulose- und Pektin-Vergärer, Buttersäure-Bildner usw. gehören. Die früher vielerörterte Frage, warum denn eigentlich der Sauerstoff ein so starkes Gift für viele anaerobe Bakterien darstelle, wird seit den Untersuchungen McLeods, Avery's u. Mitarb. (1922 bis 1925)<sup>12, 13)</sup> mit der seither oft bestätigten Tatsache in Zusammenhang gebracht, daß ihnen das Hydroperoxyd spaltende Ferment Katalase fehlt und sie daher das Primärprodukt aerober Dehydrierungen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nicht zerlegen und unschädlich machen können. Danach würde also die Giftwirkung des Sauerstoffs auf der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung beruhen.

<sup>9)</sup> Nach W. Franke, Biochem. Z. 258, 280 [1933]; ferner W. Franke, Tab. biol. period. 5, 120 [1935].

<sup>10)</sup> Vgl. auch E. I. Fulmer, Ergeb. Enzymforsch. 1, 1 [1932].

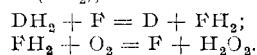
<sup>10a)</sup> Über die Abhängigkeit der Atmungsgröße vom O<sub>2</sub>-Druck vgl. W. Kempner, Cold Spring Harbor Symp. qualitat. Biol. 7, 269 [1939].

<sup>11)</sup> Mit Ausnahme der Angaben für Bakterien, die neueren Originalarbeiten (vorwiegend O. Warburgs und O. Meyerhofs) entnommen sind, nach a) S. Kostytschew: Lehrb. d. Pflanzenphysiol. I, S. 455 (Berlin 1926); b) H. A. Krebs: Haubd. d. Biochemie, Erg.-Wk. 1 B, S. 875 [1933].

<sup>12)</sup> Biochem. Z. 16, 499 [1922]; J. Pathol. Bacteriology 26, 326, 332 [1923]; 28, 147 [1925].

<sup>13)</sup> J. exp. Medicine 39, 357 [1924].

Warburg u. Christian<sup>14)</sup> konnten 1933 auf der Grundlage vorangegangener Versuche von Bertho u. Gläck<sup>15)</sup> zeigen, daß der gesamte Sauerstoff-Verbrauch des katalase- und hämin-freien Milchsäure-Bildners Bact. delbrückii über das reichlich in seinen Zellen vorhandene gelbe Flavin-Ferment (s.u.) geht. Nach ihrer wohl begründeten Auffassung entsteht das  $H_2O_2$  bei der (an sich unphysiologischen) Veratmung von Zucker durch diese normalerweise anaerob lebenden Organismen nicht, wie Bertho u. Gläck glaubt hatten, durch unmittelbare Reaktion zwischen aktiviertem Substrat ( $DH_2$ ) und  $O_2$ , sondern bei der Reoxydation der Leukoform des Farbstoffferments ( $FH_2$ ), nach den Gleichungen:



Ob die eben gegebene Erklärung in jedem Falle gilt, ist zweifelhaft, insbes. für die strikten Anaerobier vom Genus Clostridium. Neuere Befunde, wie die Möglichkeit einer Anaerobenzüchtung unter aeroben Bedingungen in Gegenwart reduzierender Stoffe (SH-Verbindungen<sup>16, 17)</sup>, Ascorbinsäure<sup>18)</sup> u. dgl.), lassen sich formal auch so auslegen, daß das Ausschlaggebende für die Entwicklung dieser Organismen die Einstellung eines tiefen Redoxpotentials im Nährmedium ist.

Das unterschiedliche Verhalten der Mikroorganismen gegenüber Sauerstoff spiegelt sich auch in der ungleichen Ausbildung des ihnen zur Verfügung stehenden Atmungssystems wider. Je stärker der aerobe Charakter einer Zellart ausgebildet ist, um so stärker entwickelt erweist sich der Apparat der Sauerstoff-Übertragung. Dies gilt vor allem für den spektroskopisch leicht nachweisbaren Eisen-Porphyrin-Komplex der 3 Cytochrome, die als Vermittler zwischen den  $O_2$ -aktivierenden Oxydasesen und den Substrat-Wasserstoff aktivierenden Dehydrasen eingeschaltet sind, weiterhin auch für die hämin-haltigen enzymatischen Katalysatoren des  $O_2$ - und  $H_2O_2$ -Umsatzes (Cytochrom- bzw. Indophenoloxidase, Peroxydase, Katalase).

Tab. 4 zeigt für eine Anzahl Mikroben eine Gegenüberstellung des — bei vollständiger Ausbildung vierbandigen — Cytochrom-Spektrums und des Verhaltes gegen Sauerstoff. Zu ergänzen ist noch, daß Acrope und fakultativ Anaerobe auch Peroxydase, Katalase

Tabelle 4.  
Cytochrom-Spektrum und Verhalten gegen Sauerstoff  
bei verschiedenen Mikroorganismen<sup>20)</sup>.

Species	Spektrum des reduz. Cytochroms
<b>A. Bakterien</b>	
Aerobe	
Bac. subtilis . . . . .	a b c d
Bac. mesentericus . . . . .	a b c d
Bac. anthracis . . . . .	a b c d
Bac. mycoides . . . . .	- h - d
Mycobacter tuberculosis . . . . .	a b c d
Azotobacter chroococcum od. vinelandii . . . . .	a b c d
Bact. pasteurianum . . . . .	a b c d
Sarc. aurantiaaca . . . . .	a b - d
Sarc. iutea . . . . .	a b c d
Microc. aureus . . . . .	a b - d
Microc. albus . . . . .	a b - d
Microc. citreus . . . . .	a b - d
Gonococcus . . . . .	a b c d
Vibr. cholerae . . . . .	a b c d
Fakultativ Anaerobe	
Bact. pyocyanum . . . . .	a b c d
Bact. fluorescens liquefaciens . . . . .	a b c d
Bact. denitrificans . . . . .	a b c d
Bact. vulgare (Proteus) . . . . .	a b c d
Bact. coli commune . . . . .	a b - d
Bact. typhosum . . . . .	a b - d
Bact. paratyphosum . . . . .	a b - d
Bact. dysenteriae Shiga od. Flexner . . . . .	a b - d
Pneumococcus I . . . . .	a b - d
Streptoc. acid. lact. . . . .	a b - d
Bact. delbrückii . . . . .	- - - -
Bact. acidiophilum . . . . .	- - - -
Anaerobe	
Clostr. tetani . . . . .	- - - -
Clostr. welchii . . . . .	- - - -
Clostr. putrefactive . . . . .	- - - -
Clostr. sporogenes . . . . .	- - - -
B. Pilze	
Bäckerhefe . . . . .	a b c d
Bäckerhefe, untergezücht . . . . .	- b c d
Porula . . . . .	a b c d
Monilia . . . . .	a b c d
Oidium . . . . .	a b c d

<sup>14)</sup> Biochem. Z. **260**, 490 [1933]. <sup>15)</sup> Liebigs Ann. Chem. **491**, 159 [1932].  
<sup>16)</sup> J. H. Quastel u. Stephenson, Biochemie. J. **29**, 1126 [1926].  
<sup>17)</sup> L. S. McCollum, Science [New York] **92**, 340 [1940].  
<sup>18)</sup> K.-H. Büsing, Zbl. Bakteriol., Parasitenkundh., Abt. II **103**, 70 [94].  
<sup>19)</sup> Bei der Korrektur gestrichen.  
<sup>20)</sup> Nach M. Stephenson, I. c.<sup>18)</sup>, z. T. berichtigt und ergänzt nach A. Fujita u. Kodama, I. c.<sup>19)</sup>, ferner W. Frei, Riedmüller u. Almasy, Biochem. Z. **274**, 253 [1934] und H. Tamura u. Yamaguchi, Acta phytochim. [Tokyo] **7**, 233 [1933].

und — soweit cytochrom-c-haltig — auch Cytochromoxydase enthalten; bei den Anaeroben fehlen diese Fermente.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen an den Hämin-Fermenten und -Zwischenkatalysatoren hat man bisher zwischen Atmungsintensität und Gehalt an Flavin-Fermenten als bekanntester Gruppe der metallfreien „Atmungsfermente“ keine eindeutigen Beziehungen herstellen können; es scheint aber eine gewisse Gegenläufigkeit zu bestehen.

Als Beleg folgen in Tab. 5 einige Angaben über den — mit den Züchtungsbedingungen etwas wechselnden — Gehalt verschiedener Mikroben an Lactoflavin sowie deren Atmungsgröße  $Q_{O_2}$ .

Tabelle 5.  
Flavin-Gehalt<sup>21, 22, 23)</sup> und Atmungsgröße<sup>21, 24)</sup>  
verschiedener Mikroben.

Spezies	mg Flavin kg Trockengew.	$Q_{O_2}$ (38°)
Bierhefe . . . . .	30	30
Bäckerhefe . . . . .	36	100
Bact. pasteurianum . . . . .	15	1000
Bact. acidi lactic . . . . .	44—66	80
Bact. coli commun . . . . .	27—42	90
Microc. aureus . . . . .	32—120	25
Bact. delbrückii . . . . .	29—115	12
Clostr. saccharobutyricum . . . . .	136	0

Nach diesen Daten ist es unwahrscheinlich, daß die physiologische Hauptrolle der Flavin-Fermente die Sauerstoff-Übertragung ist, obwohl derartige Fermente — nach v. Euler<sup>25)</sup> Diaphorase genannt — auf Grund neuerer Versuchsergebnisse an der zunächst anaeroben Weiterleitung des durch „Coenzym-Dehydrasen“ (Warburgs Pyridinproteide<sup>26)</sup>) gelockerten Substrat-Wasserstoffs an das Cytochrom-System maßgeblich beteiligt sind<sup>27, 28)</sup>. Da aber gerade die flavin-reichen Zellen — wie die in der Tabelle an den beiden letzten Stellen stehenden Organismen — cytochrom-frei sind, ist verschiedentlich die Vermutung geäußert worden<sup>21, 28, 30)</sup>, daß die Flavoproteine Fermente der Gärung, der Oxydoreduktion, seien. Eine Nachprüfung dieses Gedankens am Modellversuchen mit zwei durch Codehydrase I verbundenen Dehydrase-Substratsystemen hat indes für eine Beteiligung gelber Fermente an derartigen Oxydoreduktionen zunächst keinen Anhaltspunkt ergeben<sup>30a, 30b)</sup>. Wohl aber hat sich gezeigt, daß zur Wasserstoff-Übertragung von hydrierten Codehydrasen, z. B. auf das durch die „nichtkomplexe“ Succinodehydrase<sup>28)</sup> aktivierte Fumarat, Flavin-Ferment notwendig ist<sup>30b, 31, 32a)</sup>. Auch an der Brenztraubensäure-Dehydrierung bzw. -dismutation scheint gelbes Ferment beteiligt zu sein<sup>31b)</sup>. Man gewinnt den Eindruck, daß Flavinproteide vielleicht allgemein bei der Kopplung von Dehydrase-Systemen mit verschiedenen Codehydrasen (Co I, Co II, Aneurinpyrophosphat usw.) bzw. prosthetischen Gruppen eine Rolle spielen könnten. Schließlich läßt der besonders hohe Flavin-Gehalt der anaeroben Clostridien, die ihren Energiebedarf ja vorwiegend durch Aminosäure-Dismutation decken<sup>30)</sup>, im Verein mit der Tatsache, daß die uns bekannte Aminosäure-aerodehydrase ein Flavoprotein ist<sup>30c)</sup>, daran denken, daß die ciustweilen hypothetischen Enzyme der Aminosäure-Dismutation gleichfalls gelbe Fermente sein könnten.

### III. Synthetische Leistungen von Mikroorganismen.

Was wir heute über den Stoffaufbau in der Zelle überhaupt wissen, ist noch recht bescheiden, wenngleich gerade auf diesem Gebiet in den letzten Jahren beachtliche Fortschritte — zum Großteil durch Untersuchungen an Mikroorganismen — erzielt worden sind. Wir wollen uns bei der Besprechung des heutigen sich auf Mikroben beziehenden Wissensgutes auf die heterotrophen Organismen beschränken: einmal wegen der — nachgewiesenen oder vermuteten — Analogie zum Aufbau-Wechsel der höheren pflanzlichen oder tierischen Zellen; dann aber, weil über den Chemismus der  $CO_2$ -Assimilation in den autotrophen Bakterien noch ebensowenig Sicheres bekannt ist wie über den entsprechenden Vorgang in der grünen

<sup>21)</sup> O. Warburg u. Christian, Biochem. Z. **266**, 377 [1933].

<sup>22)</sup> H. Vetter, Ergebn. Physiol., biol. Chem., exp. Pharmakol. **38**, 855 [1936].

<sup>23)</sup> F. Schütz u. Theorell, Biochem. Z. **295**, 246 [1938].

<sup>24)</sup> Vgl. Lit. Fußnote <sup>11)</sup>.

<sup>25)</sup> Naturwiss. **26**, 187, 676 [1938].

<sup>26)</sup> O. Warburg, Ergebn. Enzymforsch. **7**, 210 [1938].

<sup>27)</sup> E. Haas, Biochem. Z. **298**, 378 [1938]; E. Haas, Horecker u. Hogness, J. biol. Chemistry **138**, 747 [1940].

<sup>28)</sup> Vgl. Zusammenfassungen von W. Francke bei Nord-Weidenhagen: Handb. d. Enzymol., S. 674ff. (Leipzig 1940); b) diese Ztschr. **53**, 580 [1940].

<sup>29)</sup> O. Warburg, Naturwiss. **22**, 441 [1934].

<sup>30)</sup> H. v. Euler, Adler u. Hellström, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **238**, 233 [1936]; **241**, 239 [1936].

<sup>31a)</sup> H. Hellström, Adler u. v. Euler, Svensk kem. Tidskr. **49**, 194 [1937].

<sup>31b)</sup> D. E. Green u. Dewar, Biochemic. J. **31**, 1069, 1074 [1937].

<sup>31c)</sup> A. v. Szent-Györgyi, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **249**, 111 [1937].

<sup>31d)</sup> D. E. Green, Dewar u. Letoir, Biochemic. J. **31**, 934 [1937].

<sup>31e)</sup> F. Lipmann, Nature **143**, 436 [1939].

<sup>32a)</sup> O. Warburg u. Christian, Biochem. Z. **298**, 150 [1938]; E. Negelein u. Bromel, ebenda **300**, 225 [1939].

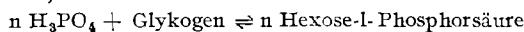
Pflanze und weil zudem der quantitative Anteil dieser Organismengruppe am Gesamthaushalt der Natur, so interessant rein qualitativ ihr eigenartiger Stoffwechselmodus auch erscheinen mag, doch nur gering ist.

### 1. Kohlenhydrat.

Gerade auf dem Kohlenhydrat-Gebiet hat die alte *Knoopsche Hypothese*<sup>32)</sup> von einem weitgehenden Zusammenfallen der biologischen Auf- und Abbauwege in den letzten 5—10 Jahren eine wesentliche experimentelle Stützung erfahren. Für zahlreiche *in vitro* studierbare Enzymvorgänge hat sich nämlich einwandfrei ergeben, daß es sich um ausgesprochene Gleichgewichtsreaktionen handelt. Noch kennen wir den Umschaltmechanismus nicht, d. h. das, was *Meyerhof* als „energetische Kopplung“ bezeichnete, wie ja überhaupt die Frage nach dem Mechanismus der Energiegewinnung aus Abbauprozessen durch die Zelle noch ganz im Dunkeln liegt. Aber schon die Tatsache, daß uns eine Reihe von thermodynamisch und biochemisch grundsätzlich gangbaren Wegstücken bekannt ist, läßt den Versuch, sie zu einem zusammenhängenden Reaktionszug der Synthese zusammenzufassen, als wohlfundierte Arbeitshypothese erscheinen; zum mindesten ist eine derartige Vorstellung ungleich besser begründet als die verschiedenen noch vor einem Jahrzehnt aufgestellten Hypothesen, in denen selbst für die Kohlenhydrat-Synthese im Muskel so wenig wahrscheinliche Zwischenstufen wie Formaldehyd oder Glykolaldehyd angenommen wurden<sup>33), 34, 35)</sup>.

Zunächst sollen in einem Schema (z. T. nach *Parnas*<sup>36)</sup>) die einzelnen Stufen des anaeroben Kohlenhydrat-Abbaus (sowie des sich u. U. anschließenden aeroben) mit besonderer Bezeichnung der bisher als reversibel ( $\rightleftharpoons$ ) erkannten Reaktionen zusammengestellt werden (Tab. 6). Die einschlägigen Befunde sind teils an Enzymlösungen aus Hefe, teils an solchen aus tierischem Gewebe (meist Muskel, auch Leber und Niere) erhoben worden; grundsätzlich wenigstens haben sich die Fermente von beiderlei Herkunft als zu den gleichen Leistungen befähigt erwiesen.

So ist, um nur ein Beispiel zu nennen, die Reversibilität der *Parnassischen Reaktion* (a) im Prinzip zuerst von *Schäffner* u. *Specht*<sup>37)</sup> (1938) erkannt worden, die eine Hcfc-Fraktion beschrieben, „die einerseits Glykogen oder Stärke zu Glucose-1-Phosphorsäure phosphorylierte, andrerseits bei Einwirkung auf Glucose-1-Phosphorsäure daraus Phosphat spontan abspaltete unter gleichzeitiger Bildung von Substanzen, die mit Jod dieselbe typische rotviolette Färbung geben, wie sie für Glykogen charakteristisch ist“. 1939 ist dann von *Kiessling*<sup>38)</sup> eine Ferment-Fraktion C — zur Unterscheidung von den *Warburgschen* Gärungsproteinen A und B<sup>39)</sup> so genannt — aus Hefemacerationssaft und Muskelextrakt isoliert worden, welche die Reaktion



in genau reversibler Weise katalysierte. Fast gleichzeitig und unabhängig sind *Cori*, *Cori* u. *Schmid*<sup>40)</sup> an Leberextrakten zu ganz analogen Ergebnissen gelangt.

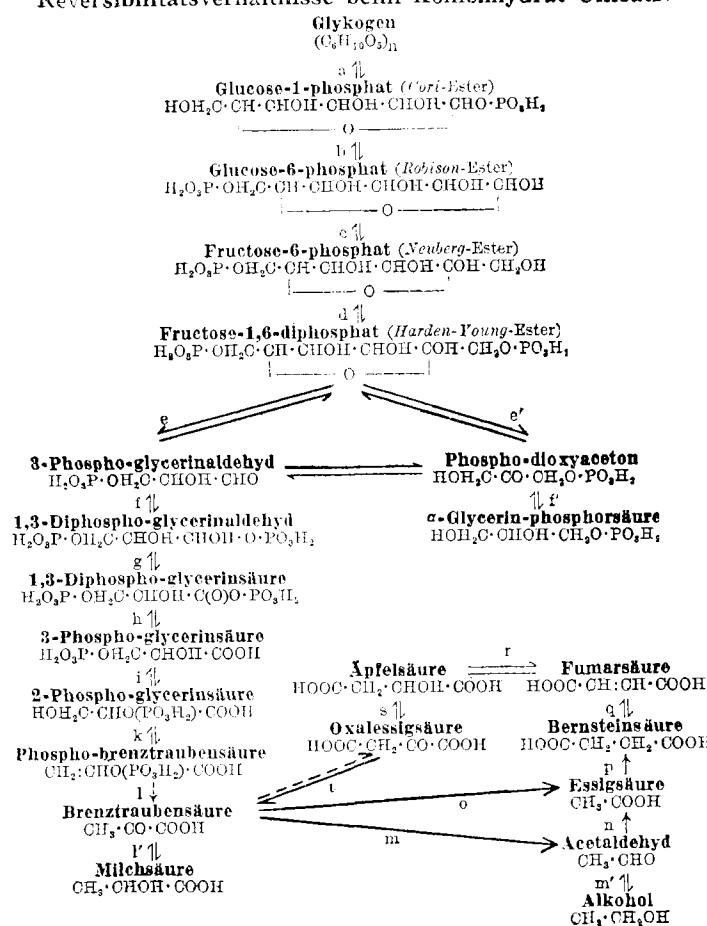
Wie ersichtlich, ist unter den typisch anaeroben Reaktionsphasen bisher nur für die Dephosphorylierung der Phosphobrenztraubensäure (l) sowie — im Falle der alkoholischen Gärung — für die Decarboxylierung der Brenztraubensäure (m) keine Reversibilität beobachtet. Bei weiteren oxydativen Abbau — im Schema durch die z. T. hypothetischen Phasen o bis t bezeichnet — kommt noch die Dehydrierung des Acetaldehyds (n) bzw. (in carboxylase-freien Zellen) der Brenztraubensäure (o) und — mit Vorbehalt, da enzymatisch noch nicht hinreichend gesichert (Abschn. IV, 2) — die Bildung der Bernsteinsäure aus Essigsäure (p) als einstweilen irreversibel hinzu.

Dagegen ist die bis vor kurzem gleichfalls als nichtumkehrbar angesehene Decarboxylierung der Oxalessigsäure (t) neuerdings — u. zw. zuerst an Propionsäure-Bakterien<sup>41, 42)</sup> — als bedingt reversibel erkannt worden. Z.T. unter Verwendung des „schweren“ Kohlenstoffisotops C<sup>13</sup> ist die CO<sub>2</sub>-Assimilation kürzlich für eine ganze Reihe weiterer heterotroper Bakterien (B. coli, B. aerogenes, Citrobacter, Proteus, Micro- und Streptococen

<sup>32)</sup> Vgl. die neuere Zusammenfassung von F. Knoop: Oxydationen im Tierkörper (Stuttgart 1931). <sup>33)</sup> J. B. Conant u. Tongberg, J. biol. Chemistry **88**, 701 [1930]. <sup>34)</sup> A. J. Kluyver, Arch. Mikrobiol., **1**, 181 [1930]. <sup>35)</sup> A. Stepanow u. Rusin, Ber. dtsch. chem. Ges. **67**, 723 [1934]. <sup>36)</sup> Siehe Beitrag zu Nord-Weidenhagen: Handb. Enzymologie, S. 910 (Leipzig 1940). <sup>37)</sup> Naturwiss. **26**, 494 [1938]; vgl. auch A. Schäffner, ebenda **27**, 195 [1939]. <sup>38)</sup> Ebenda **27**, 129 [1939]. Biochem. Z. **302**, 50 [1939]. <sup>39)</sup> O. Warburg u. Christian, ebenda **287**, 291 [1936]. <sup>40)</sup> J. biol. Chemistry **129**, 629 [1939]. <sup>41)</sup> H. G. Wood u. Werkman: a) Biochemie. J. **30**, 48 [1936]; b) **32**, 1262 [1938]; c) **34**, 7, 129 [1940]; H. G. Wood, Werkman, Hemingway u. Nier, d) J. biol. Chemistry **135**, 789 [1940]. <sup>42)</sup> H. A. Krebs u. Eggleston, Biochemie. J. **34**, 1383 [1940]; **35**, 676 [1941].

Clostridien<sup>42a)</sup> wie auch für Hefe<sup>42b)</sup> eindeutig nachgewiesen worden. Eine einfache Umkehrung der ja schon *in vitro* und nichtenzymatisch unschwer realisierbaren Oxalessigsäure-Spaltung liegt sicher nicht vor, was schon daraus hervorgeht, daß die „Carboxylierung“ der Brenztraubensäure Vitamin B<sub>1</sub> (Aneurin) erfordert<sup>42, 43)</sup>. Vieles spricht dafür, daß der ja Energie verbrauchende synthetische Prozeß<sup>49)</sup> auf dem Wege einer Reaktionskopplung erfolgt<sup>44, 45)</sup>. (So deekt *Lynen*<sup>101</sup> z. B. an die Dehydrierung eines Aldehyds und gleichzeitige Phosphorylierung von CO<sub>2</sub>.) Auch die Bildung der Phosphobrenztraubensäure ist komplexer Natur und scheint nach neuesten Untersuchungen unter Carboxylierung und Phosphorylierung (zu Phospho-oxalessigsäure) vor sich zu gehen<sup>46, 47, 47a, 47b)</sup>.

Tabelle 6.  
Reversibilitätsverhältnisse beim Kohlenhydrat-Umsatz.



Jedenfalls besteht kein grundsätzlicher Einwand gegen die Annahme, daß der in Tab. 6 aufgezeigte Reaktionsweg auch *in vivo* tatsächlich für die Glykogen-Synthese aus Brenztraubensäure beschritten wird. Deutlich tritt die Schlüsselstellung der Brenztraubensäure nicht nur beim Abbau, sondern auch beim Anbau der Kohlenhydrate hervor, eine Stellung, die noch mehr betont würde, wenn in das Schema auch noch der — ja auf der Stufe der Brenztraubensäure alternativ eingesetzende — „Citronensäure-Cyclus“ aufgenommen worden wäre. (Näheres hierzu später Abschn. IV, 1.) Durch dieses Schema finden ältere Vorstellungen u. a. von *Meyerhof*<sup>48)</sup> und v. *Euler*<sup>49)</sup> (1925), welche die Brenztraubensäure (bzw. Milchsäure) als Ausgangspunkt der Kohlenhydrat-Synthese im Muskel postuliert hatten, einerseits ihre weitgehende chemische Präzisierung, andererseits ihre zwanglose Ausweitung auch auf den Mechanismus des Kohlenhydrat-Aufbaus in carboxylase-haltigen Zellen (Hefen, viele Schimmelpilze, einige Bakterien, dazu die höheren Pflanzen). Auch der von *Quastel*<sup>50)</sup> seinerzeit gleichzeitig erhobene Be-

<sup>42a)</sup> H. G. Wood, Werkman, Hemingway u. Nier, J. biol. Chemistry **139**, 365, 377 [1941]; H. D. Shadie, Wood, Nier, Hemingway u. Werkman, ebenda **143**, 133 [1942].

<sup>42b)</sup> A. Kleinzeller, Biochemie. J. **35**, 495 [1941].

<sup>43)</sup> D. H. Smyth, ebenda, **34**, 1598 [1940].

<sup>44)</sup> H. A. Krebs, Nature **147**, 560 [1941].

<sup>45)</sup> L. O. Krampitz u. Werkman, Biochemie. J. **33**, 595 [1941].

<sup>46)</sup> F. Lipmann, Advanc. enzymol. **1**, 99 [1941].

<sup>47)</sup> H. M. Kalckar, C. em. Reviews **28**, 71 [1941].

<sup>47a)</sup> A. K. Solomon, Vennerstrand, Klempner, Buchanan u. Hastings, J. biol. Chemistry **140**, 171 [1941].

<sup>47b)</sup> Üb. Phosphorylierungen vgl. Zusammenfassung von F. Lynen, Naturwiss. **30**, 396 [1942].

<sup>48)</sup> O. Meyerhof, Lohmann u. Meier, Biochem. Z. **157**, 459 [1925].

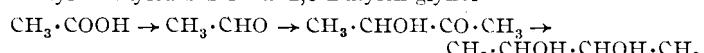
<sup>49)</sup> H. v. Euler u. Myrbäck, Svensk kem. Tidskr. **37**, 173 [1925].

<sup>50)</sup> Biochemie. J. **19**, 641 [1925]; Ergeb. Enzymforsch. **1**, 209 [1932].

fund, daß für das Wachstum von *Bact. coli* alle diejenigen Verbindungen, die in Brenztraubensäure überzugehen vermögen, als jeweils einzige C-Quelle ausreichend sind (z. B. Glycerin, Essig-, Milch-, Bernstein-, Äpfelsäure, Alanin, Asparagin-, Glutaminsäure usw.), versteht sich heute von selbst.

Einen besonderen Hinweis verdient noch der Reaktionsschritt g Diposphoglycerinsäure  $\rightleftharpoons$  Diposphoglycerinaldehyd, da er in Richtung Synthese die nach der bisherigen Auffassung biologisch ungewöhnliche Reduktion einer Carboxyl-Gruppe fordert und auch thermodynamisch die „kritische“ Stufe der Aufbaufolge darstellt<sup>61</sup>). Wahrscheinlich hängt im vorliegenden Fall die Erleichterung des Vorgangs, um dessen Aufklärung sich Warburg und seine Schule<sup>61, 62)</sup> besonders verdient gemacht haben, mit der Anhydrisierung der Carboxyl-Gruppe in der 1,3-Diphosphoglycerinsäure zusammen.

Unter diesem Gesichtspunkt gewinnt auch die in der Literatur immer wieder angegebene<sup>63, 64, 65)</sup>, doch auch in den letzten Jahren noch bestrittene<sup>66, 67)</sup> Reduktion der Buttersäure zu Butanol durch anaerobe Bacillen weiter an Wahrscheinlichkeit; vielleicht spielt auch in diesem Falle eine gekoppelte Phosphorylierung entscheidend mit. Schließlich ist auch für Bakterien der Aerogenes-Gruppe eine reduktive Kondensation von Essigsäure über Acetaldehyd und Acetyl-methylcarbinol zu 2,3-Butenyl-glykol

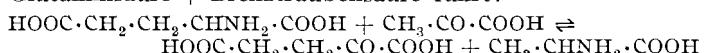
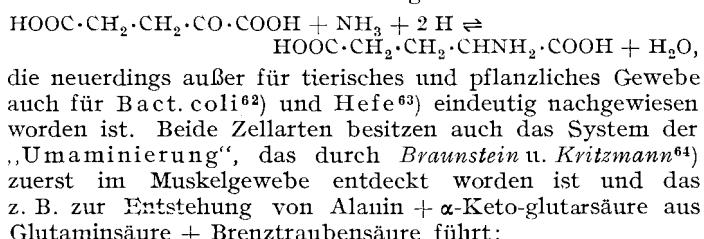


in Gegenwart vergärender Glucose behauptet worden<sup>68, 69)</sup>, kann aber nach neuen amerikanischen Arbeiten<sup>69a)</sup> noch nicht als eindeutig erwiesen gelten (vgl. auch Abschn. IV, 1).

All diese Fragen ließen sich übrigens durch Experimente mit deuterierten oder mit radioaktivem C gezeichneten Verbindungen einwandfrei klären (vgl. z. B. 69b-d).

## 2. Aminosäuren und Eiweiß.

Eine ähnlich zentrale Stellung wie die Ketomonocarbon-säure Brenztraubensäure beim Kohlenhydrat-Aufbau nehmen die Ketodicarbonylsäuren Oxalessigsäure und  $\alpha$ -Keto-glutarsäure bei der Aminosäure-Synthese ein. Was Stoffwechsel- und Modellversuche in vitro lange Zeit nur wahrscheinlich gemacht hatten, ist heute durch die eindeutigen Enzymversuche v. Eulers und seiner Schule zur Sicherheit geworden, daß nämlich der Aminosäure-Aufbau in vivo durch „reduktive Aminierung“ — entsprechend dem Abbau durch „oxydative Desaminierung“ — erfolgt<sup>60, 61)</sup>. Der wichtigste der einschlägigen Vorgänge ist die Bildung von Glutaminsäure aus  $\alpha$ -Keto-glutarsäure

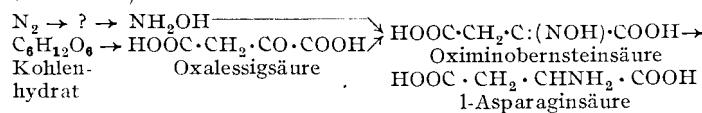


Neben diesem Hauptmechanismus der Aminosäure-Synthese spielt bei fakultativen Anaerobiern die schon länger bekannte Anlagerung von NH<sub>3</sub> an Fumarsäure unter dem Einfluß eines Ferments Aspartase<sup>65)</sup>

HOOC·CH:CH·COOH + NH<sub>3</sub>  $\rightleftharpoons$  HOOC·CH<sub>2</sub>·CHNH<sub>2</sub>·COOH eine nicht zu vernachlässigende Rolle (etwa bei glutamino-dehydrase-freien Milchsäure-Bakterien<sup>62)</sup>). Eine die weitere Umsetzung der Asparaginsäure besorgende „Aminopherase“ ist gleichfalls bekannt<sup>64)</sup>.

- <sup>61)</sup> E. Negelein u. Brömel, Biochem. Z. **301**, 135 [1939]; **303**, 132 [1939].
- <sup>62)</sup> O. Warburg u. Christian, ebenda **303**, 40 [1939].
- <sup>63)</sup> J. Reilly, Hickinbottom, Henley u. Thaysen, Biochemic. J. **14**, 229 [1920].
- <sup>64)</sup> A. J. Kluyver u. Donker, Chem. Zell. Gewebe **13**, 134 [1926].
- <sup>65)</sup> K. Bernhauer u. Mitarb., Biochem. Z. **280**, 379 [1936]; **287**, 61 [1936].
- <sup>66)</sup> A. Janke u. V. Siedler, ebenda **292**, 101 [1937].
- <sup>67)</sup> E. Simon u. C. Weizmann, Enzymologia [Den Haag] **4**, 169 [1937].
- <sup>68)</sup> H. Reynolds u. Werkman, J. Bacteriol. **33**, 608 [1937].
- <sup>69)</sup> H. Reynolds, Jacobsson u. Werkman, ebenda **34**, 15 [1937].
- <sup>69a)</sup> M. N. Mickelson u. Werkman, J. Bacteriol. **36**, 67 [1938]; **37**, 619 [1939]. Iowa State Coll. J. Sci. **13**, 157 [1939].
- <sup>69b)</sup> W. Dirscherl, Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. **47**, 705 [1941].
- <sup>69c)</sup> K. E. Schulte, Pharmaz. Zentralhalle Deutschland **83**, 133 [1942].
- <sup>69d)</sup> M. D. Kamen u. Ruben, J. appl. Physics **12**, 310, 321 [1941].
- <sup>69e)</sup> W. Franke, diese Ztschr. **52**, 695 [1939]. (Zusammenfassung.)
- <sup>69f)</sup> T. Wieland, ebenda **55**, 147 [1942]. (Zusammenfassung.)
- <sup>69g)</sup> E. Adler, Hellström, Günther u. v. Euler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **255**, 14 [1938].
- <sup>69h)</sup> E. Adler, Günther u. Everett, ebenda **255**, 27 [1938].
- <sup>69i)</sup> Enzymologia [Den Haag] **2**, 129, 138 [1937]; **5**, 44 [1938]; **7**, 25 [1939].
- <sup>69j)</sup> R. P. Cook u. Woolf, Biochemic. J. **22**, 474 [1928]; B. Woolf, ebenda **23**, 472 [1929].
- <sup>69k)</sup> A. J. Virtanen u. Tartanen, Biochem. Z. **250**, 193 [1932].

Zur Asparaginsäure führt aber auch der Weg der Stickstoff-Assimilation in den stickstoff-prototrophen Bakterien<sup>67)</sup>. Endres<sup>68)</sup> hat 1935 angegeben, daß sich in Azotobacter-Kulturlösungen rd. 10% des gebundenen Stickstoffs als Carboxim-Gruppe C: NOH — d. h. auf der Stufe des Hydroxylamins — fassen lassen, ein Befund, der bald darauf von Virtanen an dem symbiotisch lebenden *Bact. radicicola* qualitativ bestätigt worden ist. Später gelang ihm die Isolierung des Oxims und die grundsätzliche Aufklärung des Assimilationswegs im Sinne des nachstehenden Schemas<sup>69)</sup>:



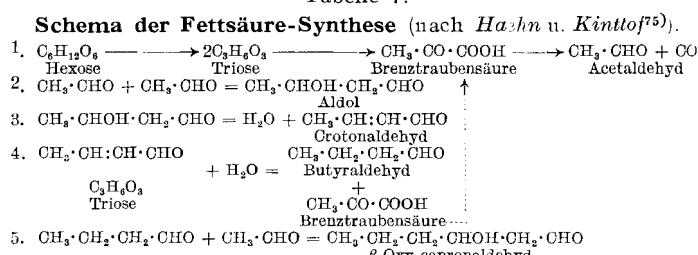
Auch bei der Assimilation von Nitrat und Nitrit durch Azotobacter wird die Stufe des Hydroxylamins durchlaufen<sup>70)</sup>. Nitrat- und Nitrit-„Reduktasen“ sind neuerdings aus *Bact. coli* und *pyocyanum* zellfrei isoliert worden<sup>71)</sup>. Es handelt sich um HCN-empfindliche Enzyme, die offenbar über irgendeinen Zwischen-acceptor mit dem durch Dehydrasen gelockerten Substrat-Wasserstoff reagieren. Es scheint hier ein neuartiger Fermenttyp der „Acceptoraktivierung“ vorzuliegen, der mit verschiedenem Spezifitätsbereich auftreten kann (z. B. Schwefelbakterien: Schwefel, Thiosulfat, Sulfat; anaerobe Bacillen: Aminosäuren Abschn. II, 3).

Über den Chemismus des Eiweiß-Aufbaus aus den primär gebildeten Aminosäuren ist für Mikroorganismen ebenso wenig etwas Genaues bekannt wie für andere Zellen und Gewebe. Rein bilanzmäßig ist für die Eiweiß-Synthese aus Kohlenhydrat + Ammon-Salz der von Fink<sup>72)</sup> an der wilden Hefe *Torula* erhobene Befund von Interesse, daß im günstigsten Grenzfall (bei starker Durchlüftung) offenbar die gleiche CO<sub>2</sub>-Menge gebildet wird wie bei der (dann ganz unterdrückten) alkoholischen Gärung, und daß der Rest des im Zuckermolekül vorhandenen Kohlenstoffs, also  $\frac{2}{3}$ , synthetisch verwertet wird<sup>73)</sup>. Dies spricht sehr dafür, daß zwischen Zellsbstanzsynthese und Abbau nicht nur eine vage energetische Koppfung im Sinne Meyerhofs<sup>74)</sup>, sondern eine wohldefinierte chemische über bestimmte Zuckerabbaustufen (C<sub>2</sub>- oder C<sub>3</sub>-Körper) vorliegt (vgl. später Abschn. IV, 2).

## 3. Fettsäuren und Fette.

Auf dem Gebiete der Fettsäure-Synthese ist die Unsicherheit hinsichtlich des Mechanismus heute noch verhältnismäßig am größten. Für das Prinzip der — wenigstens teilweise — Reversibilität, dessen Anwendung in der Frage des Kohlenhydrat- und Aminosäure-Aufbaus in den letzten Jahren ein beachtliches Stück weitergeführt hat, fehlt einstweilen noch der Angriffspunkt. Immerhin sind schon vor 10—20 Jahren Schemata der biologischen Fettsäure-Synthese für Mikroorganismen entwickelt worden, in denen Acetaldehyd als Schlüsselsubstanz auftritt, und die auch heute noch in ihren wesentlichen Punkten vertreten werden können<sup>73, 75, 76)</sup>:

Tabelle 7.



Durch sinngemäße Wiederholung der Schritte 2 und 3 gelangt man zum Capronaldehyd, von dem aus zwei Möglichkeiten bestehen, die Stufe der Stearinäure (C<sub>18</sub>) zu erreichen: a) die Reaktion setzt sich wie bisher unter stets erneuter Acetaldehyd-Anlagerung fort; b) 3 Moleküle Capronaldehyd kondensieren sich miteinander.

Eine gewisse experimentelle Stütze hatte dieses Aufbau-prinzip — die sich an die Aldol-Kondensation anschließenden beiden Folgereaktionen sind freilich durchaus ad hoc an-

<sup>73)</sup> Vgl. Zusammenfassung von R. Hüttel, diese Ztschr. **53**, 141 [1940].

<sup>74)</sup> Liebigs Ann. Chem. **512**, 54 [1934]; **518**, 109 [1935].

<sup>75)</sup> A. J. Virtanen u. Laine, Biochemic. J. **33**, 412 [1939].

<sup>76)</sup> G. Endres u. Kaufmann, Liebigs Ann. Chem. **535**, 1 [1938].

<sup>77)</sup> S. Yamagata, Acta phytotom. [Tokyo] **10**, 283 [1938]; **11**, 145 [1939].

<sup>78)</sup> H. Fink, Krebs u. Lechner, Biochem. Z. **301**, 137, 143 [1939].

<sup>79)</sup> Vgl. auch Zusammenfassung von W. Franke, Z. ges. Naturwiss. **6**, 112 [1940].

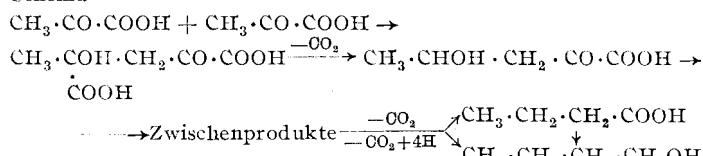
<sup>80)</sup> Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol. **22**, 328 [1923].

<sup>81)</sup> H. Haehn u. Kinttof, Chem. Zelle Gewebe **12**, 115 [1925].

<sup>82)</sup> A. J. Kluyver, Arch. Mikrobiol. **1**, 190 [1930].

genommen — an vorausgegangenen Experimentaluntersuchungen *Neubergs*<sup>77)</sup> über den Mechanismus der Buttersäure-Gärung, um so mehr, als bei dieser die gleichzeitige Entstehung der Nebenprodukte Capron-, Capryl- und Caprinsäure ( $C_6$ ,  $C_8$ ,  $C_{10}$ ) nachgewiesen war.

Die Deutung des Mechanismus der Buttersäure- und der verwandten Butanol-Gärung erfolgte im wesentlichen nach folgendem Schema



das durch die leichte Vergärbarkeit des Aldols der Brenztraubensäure (zu Buttersäure) noch besonders gestützt wurde. Neuere Versuche *Peldáns*<sup>78)</sup> bestätigten im wesentlichen die *Neubergsche* Auffassung. Die von der *Kluyver-Schule*<sup>64,79)</sup> vertretene Ansicht, daß die Kondensation erst auf der Stufe des Acetaldehyds erfolge, hat sich als unwahrscheinlich erwiesen, da 1. Acetaldoal als Zellgift nicht vergoren wurde, 2. Acetaldehyd — im Gegensatz zu den älteren Angaben *Neubergs* — sich nicht mit Sulfit abfangen ließ, und 3. die verwendeten Buttersäure-Bakterien carboxylase-frei waren. Das Prinzip der Aldol-Kondensation wird hierdurch natürlich nicht berührt.

Einen erheblichen Fortschritt in der Frage des feineren Reaktionsmechanismus der Fettsynthese bedeuten neuere Untersuchungen von *Reichel u. Schmidt*<sup>80)</sup>, wonach im Gegensatz zu den höheren gesättigten Aldehyden, die nur zu Säuren gleicher C-Zahl dehydriert werden, höhere ungesättigte Aldehyde durch den „Fettpilz“ *Endomyces vernalis* in Säuren höherer C-Zahl umgewandelt werden, was durch Ermittlung der Äquivalentwerte experimentell wahrscheinlich gemacht wurde.

So wurde bei Hexadienal  $\text{CH}_3\cdot(\text{CH}:\text{CH})_2\cdot\text{CHO}$  (Mol-Gew. 96) ein durchschnittlicher Äquivalentwert von 307 gefunden, was einer Kondensation von 3 Molekülen entspricht (Mol-Gew. der Stearinäure = 284). Octatrienal (Mol-Gew. 122) lieferte als Äquivalentwert 266, d. h. hier hatte offenbar eine Verkettung von 2 Molekülen stattgefunden. Versuche mit Crotonaldehyd und Acetaldoal (Mol-Gew. 70 bzw. 88) ergaben, daß von diesen Substanzen anscheinend 3—4 Moleküle zusammengetreten waren (Äquivalentwerte 224 bzw. 282).

Wenngleich sich endgültige Aussagen erst nach Isolierung der betreffenden Säuren machen lassen werden, scheint

<sup>77)</sup> C. Neuberg u. Arinstein, Biochem. Z. 117, 269 [1921].

<sup>78)</sup> Ebenda 309, 108 [1941].

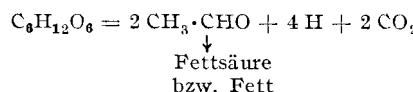
<sup>79)</sup> Ergeb. Enzymforsch. 4, 230 [1935].

<sup>80)</sup> Biochem. Z. 300, 274 [1939].

hier doch ein beachtlicher neuer Gesichtspunkt für den feineren Mechanismus der Kondensation vorzuliegen, der zu einer Revision gewisser Stufen des Schemas der Tab. 7 Anlaß geben dürfte. Nach der eindeutig festgelegten Mitwirkung eines — auch aus Hefe isolierten — Enzyms Aldolase<sup>81)</sup> beim Zucker-Auf- und -Abbau ( $2\text{C}_3 \rightleftharpoons \text{C}_6$ ) bestehen gegen die Annahme analoger Enzyme bei der Fettsäure-Synthese zum mindesten keine grundsätzlichen Bedenken mehr.

In diesem Zusammenhang verdient die Tatsache Erwähnung, daß R. Kuhn u. Mitarb.<sup>82)</sup> 1937 nach dem gleichen Prinzip bei gewöhnlicher Temperatur erstmals die Totalsynthese der Stearinäure durchführen konnten. Bei Einwirkung von Piperidin-Salzen auf Crotonaldehyd (*Knoevenael-Reaktion*) entstand neben Octatrienal und Dodekapentaenal auch Hexadekapentaenal, aus dem nach analoger Kondensation mit Malonsäure, Decarboxylierung und katalytischer Hydrierung Stearinäure erhalten wurde.

Nach *Fink*<sup>83)</sup> kann man der Fettbildung aus Zucker folgende einfache — schon bei der Eiweiß-Synthese (Abschn. III, 2) bewährte — Bilanzgleichung zugrunde legen:



wonach auf 100 g Glucose eine Ausbeute von 32 g Fettsäure zu erwarten wäre, die in Versuchen mit *Endomyces* auch nahezu erreicht wurde<sup>76)</sup>. Daß tatsächlich der Fettbildung aus Kohlenhydrat ein Abbau des Zuckermoleküls, im wesentlichen nach dem Schema der Tab. 7 vorausgeht, erscheint weiterhin belegt durch Versuche an *Endomyces*, in denen Brenztraubensäure, Milchsäure, Glycerin, Acetaldehyd oder Alkohol als Ausgangsmaterial der Fettsynthese zu fungieren vermochten<sup>75)</sup>. Ähnliche Befunde liegen auch für Hefen (einschließlich *Torula*) vor, wo sich Alkohol und Essigsäure als die besten Fettbildner erwiesen<sup>83, 84)</sup>.

Die in zahlreichen Versuchen an Mikroorganismen immer wieder bestätigte Tatsache, daß sich das im Vergleich zu Zucker doch wasserstoff-reichere Fett in größerer Menge nur unter extrem aeroben Bedingungen bildet, ist wohl wieder energetisch bedingt; in der obigen Gleichung<sup>85)</sup> tritt ja neben  $\text{CO}_2$  auch Wasserstoff auf, dessen Oxydation wohl erst die Voraussetzung für den Reaktionsablauf in Richtung Fettsynthese schafft.

Eingeg. 26. Juni 1942. [A. 30.] (Schluß folgt.)

<sup>81)</sup> Vgl. Zusammenfassung von O. Meyerhof, Ergeb. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol. 39, 10 [1937].

<sup>82)</sup> R. Kuhn, Grundmann u. Trischmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 248, IV [1937]; vgl. auch R. Kuhn, diese Ztschr. 50, 703 [1937].

<sup>83)</sup> H. Fink, Haehn u. Hoerburger, Chemiker-Ztg. 61, 689, 723, 744 [1937] (Zusammenfassung). <sup>84)</sup> I. Smedley-McLean, Ergeb. Enzymforsch. 5, 285 [1936].

<sup>85)</sup> Vgl. auch eine ähnliche Bildungsgleichung von E. F. Terroine u. Bonnet, Bull. Soc. Chim. biol. 9, 588 [1927].

## Analytisch-technische Untersuchungen

### Über die Bestimmung der Nicotinsäure (Antipellagra-Vitamin) in Pflanzen\*

Von H. ROTH und PH. SCHUSTER,

Landwirtschaftliche Versuchsstation Limburgerhof der I. G. Farbenindustrie A.-G.

Die Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß die Nicotinsäure (Pyridin- $\beta$ -carbonsäure) bzw. ihr Amid ein weiteres Vitamin des B-Komplexes ist. Sie ist in der Natur weit verbreitet. Die Pflanzen enthalten sehr unterschiedliche Mengen. Neben der Bedeutung als Pellagraschutzstoff und der Schlüsselstellung zwischen den Vitaminen  $B_1$  und  $B_2$  beim Ablauf der Redoxketten im Kohlenhydratabbau [Acetyl-anen-*inpyrophosphat* — Di- und Triphosphopyridinucleotid (Coenzym) — *Warburgsches Atmungsferment*] hat die Nicotinsäure auch Wachstumswirkung bei Ratten und gewissen Bakterien, wie z. B. Staphylokokken, Streptokokken und bestimmten Milchsäurebakterien.

Die Bestimmungsmethoden beruhen im wesentlichen auf zwei Farbreaktionen.

1. Nach E. Vongerichten entstehen aus Pyridin und 2,4-Dinitro-1-chlor-benzol Pyridiniumsalze, die durch Alkali in gelb-rot gefärbte Derivate des Glutaconaldehyds aufgespalten werden. 2. Bei der Reaktion von W. J. König bildet sich nach Aufspaltung des Pyridinringes mit Bromcyan und anschließende Kupplung mit einem primären oder sekundären Amin ein gelber bis gelb-grüner Farbstoff (wahrscheinlich ein Glutacondervat).

\* Ausführlich Vorratspflege u. Lebensmittelorsch. 5, 406 [1942].

Bei Versuchen über die Brauchbarkeit der beiden Reaktionen wurde der Bromcyanmethode der Vorzug gegeben, da mit Dinitrochlorbenzol Schmelzen hergestellt werden müssen, was für Serienuntersuchungen zu zeitraubend ist. Die Bromcyanmethode ist schneller durchführbar. Picolinsäure und Pyridinderivate mit fünfwertigem Stickstoff, wie das Trigonellin (N-Methylnicotinsäure), werden nicht miterfaßt.

Die in der Literatur teils für biologische Untersuchungen, teils für farblose oder schwach gefärbte Pflanzenauszüge beschriebenen Verfahren konnten für Untersuchungen an stark gefärbtem Pflanzenmaterial nicht benutzt werden.

Die Versuche haben gezeigt, daß 1. aus nicht weitestgehend gereinigten Auszügen die Farbreaktion beeinflussende Substanzen mit ausgeschüttelt werden und 2. die Beständigkeit der Farbe in hohem Maße von Zeit, Temperatur, der Salzkonzentration und Darstellungsart des Bromcyans abhängig ist. Unter einer größeren Zahl von Aminen, die bei der Bromcyanreaktion mit organischen Lösungsmitteln ausschüttelbare Farbstoffe bilden, bewährte sich das von Bandier u. Hald vorgeschlagene „Metol“ (p-Methylamino-phenolsulfat) am besten, da es den Farbstoff rasch entwickelt, der etwa 1 h beständig ist.