

Biologische Untersuchung der Gallensäuren.

II. Mitteilung.

Ueber eine bakterielle Gärung des Glycerins
bei Gegenwart von Desoxybiliansäure, insbesondere
durch *Bacillus subtilis*.

Von

Koozoo Kaziro.

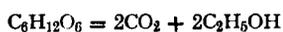
*Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama
(Vorstand: Professor Dr. T. Shimidzu.)*

Eingegangen am 23. Juli 1926.

In meiner vorigen Mitteilung habe ich über eine neue Substanz aus Cholsäure durch *Bact. coli comm.* berichtet¹⁾. In ähnlicher Weise bin ich neuerdings mit der Untersuchung des Spaltungsproduktes der Cholsäure und der Desoxybiliansäure durch *Bacillus subtilis* beschäftigt. Da der Versuch mit Cholsäure noch im Gange ist, möchte ich hier nur über den Versuch mit Desoxybiliansäure berichten. Ganz wider Erwarten erhielt ich aus der Desoxybiliansäure kein neues Spaltungsprodukt, konnte aber dabei Acetoinbildung aus Glycerin beobachten, das der Nährlösung zugesetzt war. Ich wies aus dem Reaktionsgemisch Acetoin, Acetaldehyd, Essigsäure, Ameisensäure, Milchsäure und Aethylalkohol nach. Von den Reaktionsprodukten überwiegt das Acetoin, indem alle anderen in nur sehr geringen Mengen vorhanden sind.

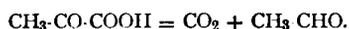
Das Gärungsproblem ist, was die alkoholische Gärung anbetrifft, seit Gay-Lussac im Jahre 1815 qualitativ und quantitativ eifrig studiert worden, gehört aber trotzdem heute noch immer zu den noch nicht völlig gelösten, schwer lösbaren Problemen.

Die Gärung in Form einer Gleichung nach Gay-Lussac



wird die normale oder die I. Gärungsform genannt. Dass der Zucker bei der Gärung nicht direkt in Alkohol und Kohlensäure zerfällt, sondern erst auf dem Wege durch verschiedene Zwischenstufen hindurch war damals noch völlig unbekannt.

Im Jahre 1911 trennte Neuberg²⁾ von dem Gärungsfermente, der Zymase, ein Carboxylase genanntes Ferment ab, das die Brenztraubensäure leicht und glatt schon bei Zimmertemperatur vergären kann.

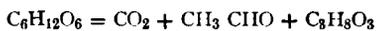


Dadurch ist klargelegt, dass die Brenztraubensäure beim Zuckerzerfall als Zwischenprodukt eine wichtige Rolle spielt und die wirklichen Zwischenprodukte des Zuckeralbaues in der C₃-Reihe zu suchen sind.

Im Jahre 1912 und 1914 gaben C. Neuberg und T. Kerb³⁾ an, dass freier Acetaldehyd von Hefe besonders leicht in Gegenwart von Glycerin zu Aethylalkohol reduciert und dass beim Zuckerzerfall zunächst auf dem Weg über die Brenztraubensäure hinweg Acetaldehyd gebildet und dieser dann weiter zu Aethylalkohol reduziert wird.

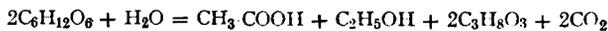
Neuberg und Färber⁴⁾ fanden nun, dass zwar die ersten Gärungsvorgänge sich bei saurer Reaktion abwickeln, dass aber die späteren ungestört ablaufen, auch wenn man nach geschehener Angärung Alkalien zusetzt.

Sie konnten bedeutende Quantitäten Acetaldehyd und Glycerin feststellen, während sie in bezug auf Kohlensäure und Alkohol eine erhebliche Verringerung fanden und so Anhaltspunkte für die zu erwartenden Zwischenstufen gewannen. Neuberg und Reinfurth⁵⁾ konnten Acetaldehyd als einen Aldehyd-Sulfit-Komplex fixieren, und diese Methode wurde von ihnen als "Abfangverfahren" bezeichnet. Es hat sich gezeigt, dass ein Unterschied zwischen der Wirkung dieser Sulfiten und der der anderen Alkalien besteht. Die neue Art der Zuckerspaltung



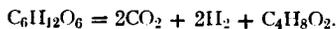
wird die zweite Vergärungsform genannt. Wird der Acetaldehyd mit Sulfiten abgefangen, so wird der zu seiner Reduktion zur Verfügung stehende Wasserstoff zur Bildung von Glycerin aus einer bis jetzt noch nicht näher bekannten Vorstufe verbraucht.

Neuerlich haben Neuberg und Hirsch⁶⁾ die Ueberzeugung gewonnen, dass es sich bei der Sulfitgärung um eine spezifische, chemische Wirkung und nicht um eine pathologische Veränderung handelt. Wenn die Gärung nicht durch Sulfiten, sondern durch andere Alkalien gehemmt wird, so treten unter ihren Produkten noch Essigsäure und Aethylalkohol auf⁷⁾



und diese Spaltung wird die dritte Vergärungsform genannt.

Die vierte Vergärungsform ist nach Neuberg und Arinstein⁸⁾ die Buttersäuregärung. Hier bilden Acetaldehyd und Brenztraubensäure in ähnlicher Weise Durchgangsglieder. An der Brenztraubensäure spielt sich scheinbar eine Aldolkondensation ab, und das entstandene Produkt geht unter Decarboxylierung durch eine Art von Saccharinumlagerung in Buttersäure über.



Die wertvolle Ansicht von Neuberg, dass die Brenztraubensäure ein Produkt der biochemischen Spaltung und zugleich ein Material für die Kohlenstoffverkettung, also ein bedeutsames Bindeglied zwischen Abbauprozessen und kernsynthetischen Vorgängen darstellt, erhellte den Weg zur Erforschung des Kohlenhydratumsatzes. Es ist durch die prachtvolle Arbeit von Neuberg und Hirsch⁹⁾ klargestellt worden, dass bei der einfachsten Kohlenstoffkettensynthese ein von ihnen Carboligase genanntes Ferment eine bedeutende Rolle spielt.

Durch carboligatische Reaktion zwischen dem Carboxyacetaldehyd und verschiedenen Aldehyden entstehen Ketonalkohole, Gebilde mit längeren unverzweigten Kohlenstoffketten. Diese Vergärungsart wird die fünfte Form genannt.

Neuberg und Hirsch¹⁰⁾ haben im Jahre 1921 im Gärgut von Saccharose oder Glukose einen Ketonalkohol, nämlich 1-Phenylacetylcarbinol $C_6H_5-CHOH-CO-CH_3$,¹¹⁾ isoliert, indem sich vor der Gärung Benzaldehyd zusetzten. Eine solche Verkettung einer aliphatischen und aromatischen Aldehyds erfolgt niemals so gut rein chemisch wie einfach katalytisch. In ihrem Versuch gelang es nicht, Benzaldehyd mit fertigem Acetaldehyd zu vereinigen, sondern mit seiner biologischen Vorstufe, der Brenztraubensäure. Nach der Meinung von Neuberg und Hirsch ist für diese biologische Acyloinbildung oder die biologische Kondensation eine im Entstehungszustande besonders reaktionsfähige Form des Acetaldehyds nötig, indem sich zunächst die Bildung von α -Benzoyl-oxy-propionsäure $C_6H_5-CO-C(OH)-CH_3$ vollzieht, die dann unter Kohlensäureverlust den Ketonalkohol liefert.



Hirsch¹²⁾ erhielt neulich Acetylmethylcarbinol biosynthetisch aus dem Gärgut von Brenztraubensäurelösung mit Isovaleraldehyd. Im Jahre 1908 meinte Neuberg schon¹³⁾ dass sich durch biologische Vorgänge aus 2 Molekülen Acetaldehyd Acetoin bilden könne. Zur Zeit steht dafür der experimentelle Nachweis noch aus. Die auf rein chemischem Wege zustande kommenden Kondensationsprodukte des Acetaldehyds waren immer die Aldole. Das Auftreten von Acetylmethylcarbinol durch Bakterienwirkung auf Zucker ist von einigen Autoren schon früher berichtet worden¹⁴⁾. Nachdem Neuberg und Hirsch die in der Gärungschemie eine so wichtige Rolle spielende Carboligase gefunden, ist die Erforschung des Schicksals des Acetaldehyds im Verlaufe der Gärung wieder von neuem zu einem interessanten Problem geworden. Neuberg und Reinfurth¹⁵⁾ haben nachgewiesen, dass im Verlaufe der normalen alkoholischen Zuckerspaltung kein Acetoin auftritt, während nach Zugabe von Acetaldehyd zu einer gärenden Zuckerlösung eine Kohlenstoffkettensynthese und mit ihr Acetoinbildung erfolgt, und weiter, dass ein Teil des sich zum Acetoin zusammenschliessenden Acetaldehyds aus dem zerfallenden Zucker stammt. De Graaf und Le Fevre¹⁶⁾ haben auch die Bildung von Acetoin bei der Vergärung der C₃-Reihe durch Koli-Typhusgruppen nachgewiesen. Diese Biosynthese, die Kohlenstoffkettenbildung aus niederen Bruchstücken, scheint auf dem Gebiete des Kohlenhydratumsatzes höchst bedeutungsvoll zu sein.

In dieser Hinsicht dürfte die Tatsache interessant und nicht ohne Belang sein, dass ich aus dem einer hinreichenden Gärung unterworfenen Gärgut, nämlich aus Glycerin und Desoxybiliansäure, reichlich Acetoin als Diacetylphenylosazon isoliert habe. Es hätte hier keine Acetoinbildung stattfinden dürfen, wenn das Acetoin in der Weise gebildet würde, wie es Neuberg und Reinfurth bemerkt haben. Bei diesem Versuche habe ich experimentell nachgewiesen, dass die Subtilisbacillen unter gewissen Bedingungen auch carboligatische Fermente produzieren können.

Es ist noch unbestimmt, ob die hinzugefügte Desoxybiliansäure bei der Acetoinbildung eine wesentliche Rolle spielt, oder ob bei der Acetoinbildung den Subtilisbacillen die Hauptrolle zuzuschreiben ist. Untersuchung nach dieser Richtung hin sind noch im Gange.

Neuberg und Sandberg¹⁷⁾ haben festgestellt, dass die Gallensäuren im freien Zustande auf Hefezellen gärungsanregend wirken und auch in ihrem Na-Salz die Gärung mit lebenden Zellen anfangs etwas erleichtern, nach einiger Zeit jedoch hemmen. Die Entwicklung der Subtilisbacillen scheint in meinem Versuch bei Gegenwart des Na-Salzes der Cholsäure (0.2%) stark gehemmt zu werden, während das bei Anwesenheit des Na-Salzes der Desoxybiliansäure (0.2%) nicht der Fall ist.

Experimenteller Teil.

10 g. reine Desoxybiliansäure wurde in berechneten Mengen einer Natriumcarbonatlösung gelöst und in 5 Liter der Sasakischen Nährlösung¹⁸⁾ gebracht. Diese Lösung wurde auf 10 Kolben verteilt, sterilisiert, mit *Subtilisbacillen* geimpft und 60 Tage lang unter täglichem Schütteln einer Bebrütung bei 37–39°C. unterworfen. Nach der Bebrütung wurde das Gärgut noch ziemlich lange Zeit bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Bakterien entwickelten sich ziemlich üppig, und schon nach einigen Tagen trat eine starke Trübung ein.

Nun wurde die bräunlich schwarz gefärbte Lösung von dem Bodensatz abfiltriert, mit verdünnter Salzsäure bis kongosauer angesäuert und von dem entstandenen Niederschlag abgesaugt.

A. Untersuchung des durch Ansäuren entstandenen Niederschlages.

Die abgesaugte schwärzliche Masse wurde in Alkohol gelöst und von der im Alkohol unlöslichen Masse abfiltriert. Aus dieser konnte ich keine einheitliche Substanz isolieren. Das alkoholische Filtrat wurde mit Tierkohle entfärbt, und in der nunmehr ziemlich hellen Lösung wurde durch Zusatz von warmem Wasser zunächst eine milchige Trübung erzeugt und alles stehen gelassen. Die in schönen feinen Nadeln auskristallisierte Säure wurde mit Barytwasser gekocht und heiss filtriert. Aus dem kristallinen Rückstand des Bariumsalses konnte ich jedoch selbst nach umständlicher Bearbeitung keine einheitliche Substanz erzielen. Der Schmelzpunkt und die Eigenschaften der aus dem im Wasser löslichen Bariumsals erhaltenen Säure stimmen mit der Desoxybiliansäure gut überein.

B. Untersuchung des von der Desoxybiliansäure abfiltrierten Filtrates.

Das Filtrat wurde mit Natriumcarbonatlösung neutralisiert und ein Drittel desselben abdestilliert, das ich neutrales Destillat nenne. Der Destillationsrückstand wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, mit dem halben Volumen Wasser verdünnt und davon wieder ein Drittel abdestilliert, das ich als saures Destillat bezeichne.

1) Untersuchung des neutralen Destillates.

Das neutrale Destillat zeigte nach Zusatz von Alkalilauge eine vorübergehende schöne violettrote Färbung und reduzierte Fehlingsche Lösung schon in der Kälte sowie ammoniakalische Silberlösung. Molybdänsaures Ammon gab beim Erhitzen eine tiefblaue Färbung des Destillates. Die Resorcin-Salzsäure-Probe ergab eine gelbe Färbung. Nitroprussidnatriumlösung und Natronlauge gaben eine intensiv rote Färbung, die bald durch Ansäuerung blasser wurde.

Prüfung auf Acetaldehyd.

Das Destillat zeigte eine charakteristische Blaufärbung mit Piperidin und Nitroprussidnatriumlösung, die bei längerem Stehen in violettrot und darauf in purpurrot überging. Die Jodformreaktion fiel stark positiv aus. Die Darstellung von Acetaldehydphenylhydrazon ist mir misslungen.

Prüfung auf Aethylalkohol.

Aethylalkohol wurde an dem Geruch von Benzoesäureathylester erkannt, der sich durch Zusatz von Benzoylchlorid zum Destillat bildet.

Prüfung auf Methylacetylcarbinol.

Das Destillat drehte polarimetrisch nach links. Das Methylacetylcarbinol wurde als Diphenylosazon isoliert, und es betrug ca. 20 g. Rohprodukt. Es stellte schöne hellgelbe kleine Prismen vom Schmelzpunkt 243–245°C. dar.

Analyse:

3.6425 mg. Substanz: 0.671 ccm. N. (15°C. 773.7 mm.)

$C_{16}H_{18}N_4$. Ber. N. 21.04 Proz; gef. N. 21.40 Proz.

2) Untersuchung des sauren Destillates.

Das saure Destillat reagiert ziemlich stark sauer auf Lackmus und reduzierte Fehlingsche Lösung schon in der Kälte.

Prüfung auf Ameisensäure.

Das mit Silberoxyd versetzte Destillat bildete an der Gefäßwand einen Silberspiegel. Die genau neutralisierte Lösung des Destillates wurde durch Zusatz von Eisenchloridlösung leicht getrübt.

Prüfung auf Essigsäure.

Die mit Natriumcarbonatlösung genau neutralisierte Lösung zeigte durch Zusatz von Eisenchloridlösung eine blutrote Färbung. Das Destillat wurde mit Calciumcarbonat neutralisiert, eingedampft und der Rückstand trocken destilliert. In dem ins Wasser eingeleitete Destillat wurde Aceton mittels Jodform- und Nitroprussidnatriumlösungsreaktion nachgewiesen. Auch die Kakodylreaktion fiel positiv aus.

3) Untersuchung des Rückstandes.

Der Destillationsrückstand wurde mit Wasser verdünnt und wiederholt abdestilliert, bis keine reduzierbaren Stoff mehr entwichen. Dieser Rückstand wurde nach dem Einengen auf kleines Volumen nach der Kumagawa-Suttoschen Methode mit Aether erschöpfend ausgezogen. Der Aetherrückstand wurde im Wasser gelöst und von der im Wasser unlöslichen Desoxybiliansäure abfiltriert. Das Filtrat wurde auf Milchsäure mittels der Hopkinsschen Reaktion geprüft, die positiv ausfiel. Aus dem Filtrat konnte

ich mittelst der Pyrrolreaktion keine Bernsteinsäure nachweisen. Das Filtrat wurde mit Barytwasser genau neutralisiert und von dem ausgeschiedenen Bariumsulfat abfiltriert. Dieses Filtrat wurde mit Alkohol ausgesalzen, um Bernsteinsäure und Milchsäure von einander zu trennen. Aus dem von dem ausgesalzene Bernsteinsäuresalze abgetrennten Filtrat gewann ich zwar etwas Zinklaktat, das aber leider zur Analyse nicht genügte.

Zum Schluss möchte ich Herrn Itano vom Hygienischen Institut von Okayama meinen besten Dank für seine freundliche Hilfe bei der Isolierung der Bakterien aussprechen.

Literatur

- 1) **K. Kaziro**, Z. f. physiol. Chemie, 145, 227 (1925). 2) **C. Neuberg u. Karczog**, Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft, 44, 2477 (1911). 3) **Neuberg u. T. Kerb**, Bioch. Z. 53, 158 (1914). 4) **Neuberg u. Färber**, Bioch. Z. 78, 238 (1916). 5) **Neuberg u. Reinfurth**, Bioch. Z. 89, 36 u. 92, 234 (1919). 6) **Neuberg u. Hirsch**, Bioch. Z. 98, 141 (1919). 7) **Neuberg u. Hirsch**, Bioch. Z. 96, 175, 98, 141, 101, 304 (1919). 8) **Neuberg u. Arinstein**, Bioch. Z. 117, 263 (1921). 9) **Neuberg u. Hirsch**, Bioch. Z. 115, 287, 115, 282 (1921). 10) **Neuberg u. Hirsch**, Ebenda. 11) **Neuberg u. Ohle**, Bioch. Z. 127, 327 (1921). 12) **Hirsch**, Bioch. Z. 131, 178 (1922). 13) **Neuberg**, Oppenheimers Handbuch der Biochemie I. 225 (1908) u. Ergänzungsband dazu 609 (1913). 14) **Hirsch**, Bioch. Z. 131, 178 (1922). **Grimbert**, C. r. 132, 706 (1901). **Desmots**, C. r. 138, 581 (1904). **Klings**, C. r. 140, 1456 (1905). **Harden u. Walpole**, Ch. C. 1906, I. 1560 u. 1911, I. 1309. **Pastrureau**, J. d. Pharm. et de Chim. 27, 10 (1908). **Lemoinge**, C. r. 155, 792 (1912). **Maze**, C. r. 156, 1101 (1913). **Ruot**, C. r. 157, 297 (1913). **Farnsteiner**, Z. f. Unters. Nahrungs- u. Genussmittel, 15, 321 (1908). **Balcom**, Am. Soc. 39, 309. 15) **Neuberg u. Reinfurth**, Bioch. Z. 143, 553 (1923). 16) **de Graf u. Fevre**, Bioch. Z. 155, 313 (1925). 17) **Neuberg u. Sandberg**, Bioch. Z. 126, 153 (1921). 18) **Kaziro**, Z. f. physiol. Chem. 145, 233 (1925). **T. Sasaki**, Bioch. Z. 59, 432 (1914).

内 容 大 意

胆汁酸ノ生物學的研究 (第二報)
 枯草菌ニヨル「グリセリン」醱酵ニ就テ

岡山醫科大學醫化學教室 (主任清水教授)

上 代 皓 三

余ハ前ニ大腸菌ノ作用ニヨル「Cholsäure」ノ新分解産物ニ就テ報告セリ。次デ同ジ目的ノ下ニ「Cholsäure」竝ニ「Desoxybiliansäure」ニ枯草菌ヲ作用セシメント企テタリ。本實驗ニ於テ余ハ所期ノ分解産物ヲ得ル事能ハザリシモ、其際培養液トシテ用ヒタル「グリセリン」ノ醱酵ニ於テ稍興味アル結果ヲ觀タルガ故ニココニ報告セントス。即余ハ「Desoxybiliansäure」ノ分解ヲ企テタル「グリセリン」ヲ含ム培養液中ニ「メチルアセチルカルピノル」「アセトアルデヒド」「醋酸」「蟻酸」「乳酸」竝ニ「エチルアルコール」ノ生成セシコトヲ證明シ得タリ。而シテ其際「ヂアセチルフエニルオサツオン」トシテ分離セシ「メチルアセチルカルピノル」ノ量ハ甚ダ多量ニシテ、コレガ主要所産物ナルコトハ疑ナシ。コノ「メチルアセチルカルピノル」ハ「グリセリン」醱酵ニ由リテ生ジタル「アセトアルデヒド」ノ二分子ノ結合ニヨリテ生ジタルモノト見ルベク、コレニヨリテ Neuberg ノ所謂「カルボリガアゼ酵素」ハ尙或條件ノ下ニ於テ枯草菌ニヨリテモ産出シ得ルモノナル事ヲ明ラカニセリ。コノ「メチルアセチルカルピノル」ノ生成ニ對シテ胆汁酸ノ存在ガ決定的ニ關與スルモノナリヤ、又ハ枯草菌其自體ノ單獨ナル動作ニ因スルモノナリヤニ就テハ尙決定シ得ズ。余ノ觀察シタルトコロニヨレバ枯草菌ノ發育ハ、0.2%「Cholsäure 曹達鹽」ニヨリテ妨ゲラルルモ、0.2%「Desoxybiliansäure 曹達鹽」ニヨリテハ妨ゲラレザルガ如シ。

