

Zur Bildung von Diacetyl aus Brenztraubensäure mit Acetaldehyd und Acetoin als Zwischenprodukte bei bakteriellen Gärungen

O. E. NIKKILÄ

Laboratorium von Valio, Biochemisches Institut, Helsinki, Finnland

Die Bildungsreaktionen von Diacetyl, Acetoin (Acetylmethylcarbinol) und 2,3-Butylenglykol sind seit dem Beginn dieses Jahrhunderts und zumal, nachdem van Niel, Kluyver und Derx¹ sowie Schmalfuss und Barthmeyer² im Jahre 1929 das Diacetyl als den eigentlichen Aromastoff der Butter nachwiesen, Gegenstand eifriger Forschung gewesen. Die meisten Autoren, die sich mit dem Studium jener Reaktionen befasst haben, sind sich darüber einig, dass die Reaktion über Brenztraubensäure geht. Da aber das Diacetyl leicht zu Acetoin und dieses weiter zu 2,3-Butylenglykol reduziert wird und die Oxydation in der entgegengesetzten Reihenfolge stattfindet, ist es schwierig gewesen zu entscheiden, welcher von diesen Stoffen primär entsteht. — In der vorliegenden Arbeit wird für Diacetyl, Acetoin und 2,3-Butylenglykol der Einfachheit halber und weil keine anderen vier Kohlenstoffatome enthaltenden Substanzen hier Behandlung finden, die gemeinsame Bezeichnung C₄-Verbindungen gebraucht.

Neuberg und Mitarbeiter³⁻¹² nehmen an, dass das Acetoin durch Acyloinkondensation auf die Weise entsteht, dass durch Einwirkung der Hefecarboxylase aus Brenztraubensäure Kohlendioxyd abgespaltet wird unter Bildung von Acetaldehyd, der sich *in statu nascendi* durch Einwirkung eines besonderen Enzyms, der Carboligase, mit dem stabilen (auch zugesetzten) Acetaldehyd verbindet. Das primär entstandene Acetoin würde dann zu Diacetyl oxydiert und zu 2,3-Butylenglykol reduziert. Dirscherl und Mitarb.¹³⁻¹⁷, Langenbeck und Mitarb.¹⁸⁻²², Tanko und Munk²³ sowie Silverman und Werkman²⁴ haben indessen die Beteiligung der Carboligase an diesen Vorgängen bezweifelt.

Van Beynum und Pette^{25, 26} sowie Sjöström²⁷ vermuten Acetaldehyd als Zwischenprodukt bei der Bildung der fraglichen Stoffe durch Einwirkung der Aromabakterien der Butter. Sein experimenteller Nachweis in den Gärlösungen der erwähnten Organismen ist den Autoren allerdings nicht gelungen. Sie halten die biologische Oxydation des

Acetoins zu Diacetyl nicht für möglich, sondern sind der Ansicht, dass der Acetaldehyd direkt zu Diacetyl oxydiert wird.

Virtanen und Tarnanen²⁸, Virtanen²⁹ und Virtanen und Nikkilä^{30, 31} haben in gewissen Ausnahmefällen bedeutende Mengen Acetaldehyd in Säureweckerkulturen gefunden, dagegen nicht unter normalen Bedingungen. Der Acetaldehyd entsteht als die Folge der Tätigkeit besonderer sog. Malzaromabakterien, und das Malzaroma wird auch eben durch den in der Lösung angehäuften Acetaldehyd hervorgerufen^{30, 31}. Die eigentlichen Aromabakterien bilden dagegen keinen Acetaldehyd. Die Autoren sind der Meinung, dass als erstes Kondensationsprodukt Acetoin entsteht, das dann weiter zu Diacetyl oxydiert wird.

Nach Storgårds³² geht das Acetoin bei den Aromabakterien ohne Acetaldehyd als Zwischenprodukt aus zwei Molekülen Brenztraubensäure hervor. An dieser Reaktion nimmt nach Virtanen³³ nebst Silverman und Werkman²⁴ ein von der Hefecarboxylase verschiedenes Enzym teil.

Auch Green, Westerfeld, Vennesland und Knox³⁴ sind der Meinung, dass aus je zwei Molekülen Brenztraubensäure ein Molekül Acetoin gebildet wird. Sie nehmen aber immerhin an, dass bei der Reaktion zuerst Acetaldehyd entsteht, der sich dann mit dem einen Brenztraubensäuremolekül zu einem Zwischenprodukt kondensiert, aus welchem erst durch Abspaltung eines neuen CO₂-Moleküls das Acetoin hervorgeht.

Werkman und Mitarb.^{35, 36} haben sowohl aus Bakterien und Hefe als aus Herzmuskel des Schweins Enzympräparate hergestellt, die die Fähigkeit besaßen, Acetaldehyd zu Acetoin zu verarbeiten. Werkman ist auch der Meinung, dass die Bildung der C₄-Verbindungen aus der Brenztraubensäure auf verschiedenen Wegen erfolgen kann.

Bång^{37, 38} hat eine Theorie vorgelegt, welcher gemäss die Aromabakterien die Brenztraubensäure ohne zwischengeschaltete Acetaldehydphase direkt zu Diacetyl verarbeiten. Das primär entstandene Diacetyl entzieht dem Alkohol Wasserstoff und wird zu Acetoin und weiter zu 2,3-Butylenglykol reduziert.

Auch Martius³⁹ vermutet, dass das Diacetyl primär gebildet wird. Nach ihm entsteht aber aus der Brenztraubensäure durch Abspaltung von Wasserstoff und Kohlendioxyd zunächst ein ketonartiges Radikal (CH₂ = CO), welches unter anaeroben Bedingungen als Wasserstoffakzeptor fungiert und zu Acetaldehyd reduziert wird. Das Radikal kann sich ferner auch mit dem Acetaldehyd verbinden, wobei Diacetyl gebildet wird, welches Wasserstoff aufnimmt und zu Acetoin nebst 2,3-Butylenglykol reduziert wird. Bei der nach der Martiusschen Radikaltheorie erfolgenden Diacetylbildung wäre gemäss Suomalainen und Jännes⁴⁰ ein vom Thiamin gebildetes Oxydoreduktionssystem (vgl. Myrbäck, Vallin und Magnell⁴¹) tätig.

EXPERIMENTELLER TEIL

Das Bakterienmaterial und Ansetzen der Gärungen

Die Diacetyl- bzw. Acetoinbildung wurde an sowohl aus malzaromatischem als aus normalem Säureweckern isolierten Aromabakterien untersucht. Das erstere, das sog. Malzaromabakterium (Stamm M), unterscheidet sich von den normalen Aromabakterien des Säureweckers vornehmlich dadurch, dass es Carboxylase enthält und vermittels derselben aus Brenztraubensäure Acetal-

dehyd bildet (vgl. Virtanen und Nikkilä^{30, 31}). Das aus normalem Säurewecker isolierte Bakterium brachte die Milch zum Koagulieren und dürfte in erster Linie bei den Aromabakterien vom Typ des *Streptococcus paracitrovorus* (Hammer) unterzubringen sein.

Zur Herstellung von Zellmasse für die Gärversuche wurden die Malzaromabakterien einen bis anderthalb Tage lang bei 37° C in einer Nährlösung von folgender Zusammensetzung gezüchtet:

- 5 l geklärte Molke (nach Karström⁴²)
- 13 g Pepton
- 90 » Presshefe
- 25 » Citronensäure

Die Züchtung des *Streptococcus paracitrovorus* erfolgte in der von Hammer⁴³ empfohlenen und nach Storgårds³² bereiteten, Tomatenauszug enthaltenden Nährlösung bei 28° C.

Die entstandenen Säuren wurden während der Kultivierung durch Zusatz von 10 %iger NaOH-Lösung neutralisiert, wodurch sich die Reaktion der Nährlösung dauernd ungefähr bei ihrem ursprünglichen Wert (pH 6,2) hielt.

Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugieren von der Nährlösung abgeschieden und zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Die so erhaltene Bakterienmasse wurde sodann entweder möglichst homogen in Wasser suspendiert oder bei Zimmertemperatur auf Tontellern getrocknet und trocken gemahlen, oder es wurde aus ihr nach Kalnitsky, Utter und Werkman⁴⁴ eine zellfreie Enzymlösung hergestellt.

Die Gärversuche erfolgten in *M*/20 Phosphatpufferlösungen. Während derselben wurde die Azidität der Gärlösungen durch Zusatz von 0,5 *N* NaOH-Lösung oder durch Anwendung von CaCO₃ als Neutralisationsmittel auf möglichst konstanter Höhe gehalten. Eine genügende Homogenität der Lösungen wurde durch mechanisches Schütteln oder mit Hilfe eines Mischers erzielt. Die aeroben Gärversuche erfolgten in mit Rückflusskühlern ausgerüsteten, etwa zur Hälfte gefüllten Erlenmeyerkolben zu 500 ml. Die anaeroben Versuchsbedingungen wurden durch Verjagen der Luft mittels Stickstoff aus den Gärkolben erzielt. Gärzeit, pH und sonstige Einzelheiten erhellen im Zusammenhang mit den einzelnen Versuchen. Am Ende der Versuche wurden die Gärungen in den verschiedenen parallelen Kolben gleichzeitig durch Erhitzen unter Rückflusskühlern abgebrochen.

Die Analysenmethoden

Der Gehalt der zu untersuchenden Gärlösungen an unvergorenem Zucker wurde im neutralisierten Schenck-Filtrat nach Bertrand ermittelt.

Die Citronensäure wurde nach Kometiani⁴⁵, die Brenztraubensäure nach Straub⁴⁶ bestimmt.

Die Milchsäure wurde gemäss der in diesem Laboratorium üblichen Methode im Schenck-Filtrat, aus welchem die Kohlehydrate nach Salkowsky und van Slyke besei-

tigt worden waren, nach dem Prinzip von Friedemann, Cotonio, Shaffer und Kendall⁴⁷ mit einem von Lieb und Zacherl⁴⁸ konstruierten Apparat bestimmt.

In demselben Apparat erfolgte auch die quantitative Bestimmung des Acetaldehyds so, dass letzterer in $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung überdestilliert und dann in dieser jodometrisch bestimmt wurde. Sein qualitativer Nachweis fand nach den Anweisungen von Rimini⁴⁹ statt. In diesem Zusammenhang wurde auch festgestellt, dass die von Block und Bolling⁵⁰ angewandte Methode zur Bestimmung von Acetaldehyd mittels *p*-Hydroxydiphenyl entgegen den Angaben der Autoren nicht völlig spezifisch ist, denn auch das Diacetyl reagiert in diesem Versuch ähnlich wie der Acetaldehyd.

Das Diacetyl wurde nach White, Krampitz und Werkman⁵¹ photometrisch bestimmt. Acetoin und 2,3-Butylenglykol wurden nach Kniphorst und Kruisheer⁵² mit FeCl_3 zu Diacetyl oxydiert und danach wie oben bestimmt.

Gärversuche mit lebenden Malzaromabakterien

Das pH-Optimum der Diacetyl- bzw. Acetoinbildung

Es ist schon lange bekannt gewesen, dass saure Reaktion die Acetoin- bzw. Diacetylbildung im Säurewecker begünstigt. Viele Forscher haben diese Tatsache auch im Laboratorium festgestellt. Da das pH-Optimum dieser Bildungsprozesse bei den verschiedenen Bakterien verschieden sein kann, war es für die Ausführung der folgenden Versuche wichtig, diese Umstände auch bei dem Malzaromabakterium kennen zu lernen.

Zu diesem Zweck wurden Gärungen mit der gleichen Bakteriensuspension in Glucose-Phosphatlösungen mit verschiedenem pH unter aeroben Bedingungen ausgeführt und die während 20stündiger Gärzeit gebildeten Mengen von C_4 -Verbindungen (Diacetyl, Acetoin und 2,3-Butylenglykol) bestimmt. Fig. 1 zeigt die Resultate.

Man ersieht, dass das pH-Optimum der Bildung von C_4 -Verbindungen beim Malzaromabakterium etwa bei pH 5,4 liegt.

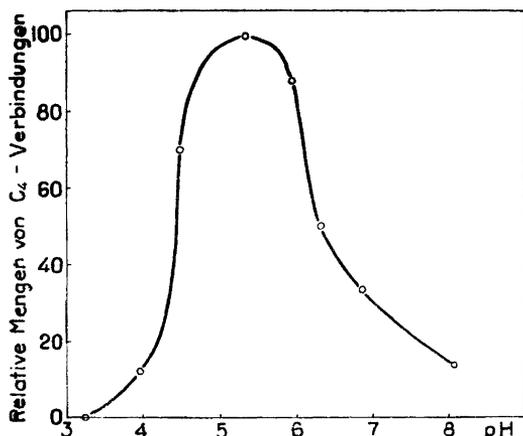


Fig. 1. pH-Abhängigkeit der Bildung der C_4 -Verbindungen.

**Brenztraubensäure, Brenztraubensäure + Acetaldehyd und
Acetaldehyd als Substrat**

In den nachfolgenden Versuchsreihen, deren Resultate in Tabelle 1 wiedergegeben sind, wurde die Bildung der C₄-Verbindungen in parallelen aeroben Gärversuchen untersucht, in denen entweder Brenztraubensäure allein (I), Brenztraubensäure und allmählich zugesetzter Acetaldehyd (II) oder Acetaldehyd allein (III) als Substrat dienten.

Tabelle 1. Aerober Gärversuch mit dem Malzaromabakterium und mit Brenztraubensäure (I), Brenztraubensäure + Acetaldehyd (II) und Acetaldehyd (III) als Substrat. Gärzeit 20 Stunden, Temperatur 40° C, pH 5,6.

		I	II	III
Brenztraubensäure	zugesetzt, mg	500	500	—
Acetaldehyd (allmählich)	» »	—	500	500
Brenztraubensäure	vergoren, »	470,1	470,2	—
Acetaldehyd	gebildet, mg	15,0	—	—
Diacetyl	» »	1,21	0,74	0,74
Acetoin	» »	5,68	16,12	3,43
2,3-Butylenglykol	» »	1,82	2,21	0
C ₄ -Verbindungen zusammen	» »	8,71	19,07	4,17

Wie aus den Versuchsergebnissen zu ersehen ist, wird aus Brenztraubensäure durch Einwirkung des Malzaromabakteriums Acetaldehyd gebildet. Das genannte Bakterium enthält also Carboxylase. Der Acetaldehyd wird bei der Reaktion nicht vollständig verbraucht, sondern häuft sich in der Lösung an. In dieser Versuchsreihe wurden beim Abbruch des Versuches in der Gärlösung I etwa 3,2 % Acetaldehyd, auf die vergorene Brenztraubensäure bezogen, gefunden. Das Malzaromabakterium hat aus Brenztraubensäure Diacetyl, Acetoin und 2,3-Butylenglykol gebildet; davon ist die Menge des Acetoin am grössten. C₄-Verbindungen insgesamt wurden in der Gärlösung I zu 1,8 % der vergorenen Brenztraubensäure gebildet; in der Gärlösung II, die neben Brenztraubensäure zugesetzten Acetaldehyd enthielt, beläuft sich der entsprechende Wert auf 4,1 %, also auf mehr als den doppelten Betrag im Vergleich zur Gärlösung I. Der zugesetzte Acetaldehyd hat in der Gärlösung II eine Erhöhung der Acetoinmenge verursacht, die durch seine Einwirkung etwa auf das 3fache gestiegen ist. In bezug auf die Diacetyl- und 2,3-Butylenglykolenmengen sind die Unterschiede zwischen den Gärlösungen I und II relativ gering.

Die Geschwindigkeit der Brenztraubensäuregärung scheint durch den Acetaldehydzusatz nicht beeinflusst worden zu sein, denn die Mengen der vergorenen Brenztraubensäure sind sich in beiden Versuchen (I und II) gleich.

In der Gärlösung III diente als ausschliessliches Substrat Acetaldehyd, der der Lösung im Verlauf des Versuches allmählich zugesetzt wurde. Das Malzaromabakterium ist, wie aus den Resultaten hervorgeht, imstande gewesen, den zugesetzten Acetaldehyd ohne Gegenwart von jeglichen anderen Substraten zu C₄-Verbindungen zu synthetisieren.

Die Resultate der obigen Versuchsreihe berechtigen uns zu dem Schluss, dass die Bildung der C_4 -Verbindungen aus Brenztraubensäure beim Malzaromabakterium über Acetaldehyd erfolgt. Der Befund, dass der zugesetzte Acetaldehyd namentlich gerade zu einer Erhöhung der Acetoinmenge geführt hat (II), deutet auf die primäre Bildung des letzteren hin.

Die Abfangung des Acetaldehyds während der Gärung

Neuberg hat gezeigt, dass man bei Hefegärungen den naszierenden Acetaldehyd durch geeignete Abfangmittel fixieren und dadurch den Verlauf der Reaktionen beeinflussen kann. Sofern die oben geäußerte Annahme bezüglich des Auftretens von Acetaldehyd als Zwischenprodukt bei der Bildung der C_4 -Verbindungen durch das Malzaromabakterium richtig ist, müsste es theoretisch möglich sein, auf jene Bildungsreaktionen durch Abfangen des Acetaldehyds bei den betreffenden Gärungen einzuwirken.

Tabelle 2 zeigt die Resultate eines mit dem Malzaromabakterium ausgeführten Versuches, in welchem Citronensäure als Substrat und (in der Gärlösung II) $CaSO_3$ als Abfangmittel für Acetaldehyd diente. Als Neutralisationsmittel kam $CaCO_3$ zur Anwendung. Die Homogenität der Lösungen wurde während des Versuches durch mechanische Mischung aufrechterhalten.

Tabelle 2. Aerobes Gärversuch mit dem Malzaromabakterium, Citronensäure als Substrat. Zur Fixierung des bei der Gärung gebildeten Acetaldehyds wurde der Gärlösung II $CaSO_3$ zugesetzt. Gärzeit 48 Stunden, Temperatur $40^\circ C$, pH 6,0.

		I	II
Citronensäure (neutr.)	zugesetzt, mg	6000	6000
$CaSO_3$ als Abfangmittel	» g	—	4
Citronensäure	vergoren, mg	4575,0	4269,0
Acetaldehyd	gebildet, mg	7,6	39,9
Diacetyl	» »	13,7	12,9
Acetoin	» »	178,8	66,7
2,3-Butylenklykol	» »	333,0	180,0
C_4 -Verbindungen zusammen	» »	525,6	259,6

Aus den Resultaten ist zu ersehen, dass die Fixierung des naszierenden Acetaldehyds einen sehr deutlichen Einfluss auf die Mengen der gebildeten C_4 -Verbindungen sowie die des unter den Endprodukten gefundenen Acetaldehyds gehabt hat. In der Gärlösung ohne $CaSO_3$ wurden 0,17 % und in der mit $CaSO_3$ 0,93 % vom vergorenen Substrat Acetaldehyd gefunden. Für die C_4 -Verbindungen ergeben sich als entsprechende Werte 11,5 % und 6,1 %. Diese Ergebnisse erweisen deutlich, dass beim Malzaromabakterium der Abbau der Citronensäure über Brenztraubensäure und Acetaldehyd zu den C_4 -Verbindungen geht.

Acetoin als primäres Kondensationsprodukt

Die oben mitgeteilten Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass das Acetoin vor dem Diacetyl und dem 2,3-Butylenglykol gebildet wird. Zur Bestätigung dieser Annahme wurden in der folgenden Versuchsreihe die aus der Brenztraubensäure gebildeten C₄-Verbindungen in kurzen Zeitabständen bestimmt. Gleichzeitig wurden die Veränderungen des Redoxpotentials elektrometrisch verfolgt. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse; die Veränderungen des Redoxpotentials während der Gärungen sind in Fig. 2 dargestellt.

Tabelle 4. Gärversuch mit Malzaromabakteriensuspension, Brenztraubensäure als Substrat. Bestimmungen der Brenztraubensäure und der C₄-Verbindungen erfolgten 2, 5, 12 und 25 Stunden nach Beginn des Versuches. Temperatur 40° C, pH 5,5.

		Aerob	Anaerob
Nach 2stündiger Gärung:			
Brenztraubensäure	vergoren, mg	77,7	50,5
Diacetyl	gebildet, »	0	0
Acetoin	» »	10,73	2,40
2,3-Butylenglykol	» »	0	0
C ₄ -Verbindungen zusammen	» »	10,73	2,40
Nach 5stündiger Gärung:			
Brenztraubensäure	vergoren, mg	118,6	104,6
Diacetyl	gebildet, »	1,79	0,60
Acetoin	» »	11,92	4,21
2,3-Butylenglykol	» »	0,60	1,80
C ₄ -Verbindungen zusammen	» »	14,31	6,61
Nach 12stündiger Gärung:			
Brenztraubensäure	vergoren, mg	178,2	176,7
Diacetyl	gebildet, »	1,79	1,21
Acetoin	» »	11,32	5,71
2,3-Butylenglykol	» »	2,98	3,31
C ₄ -Verbindungen zusammen	» »	16,09	10,22
Nach 25stündiger Gärung:			
Brenztraubensäure	vergoren, mg	274,6	327,0
Diacetyl	gebildet, »	1,79	1,20
Acetoin	» »	6,56	3,55
2,3-Butylenglykol	» »	16,39	9,44
C ₄ -Verbindungen zusammen	» »	24,74	14,19
Milchsäure	» »	38,46	75,69

Man ersieht deutlich, dass die Bildung der C₄-Verbindungen durch aerobe Bedingungen stark begünstigt wird. Beim Abbruch des Versuches (nach 25 Stunden) wurden in der aeroben Gärung insgesamt 24,74 mg C₄-Verbindungen gefunden, was 9,0 % der vergorenen Brenztraubensäure ausmacht, während die entsprechenden Werte in der anaeroben Gärung nur 14,19 mg und 4,4 % betragen.

Das Redoxpotential der aeroben Gärung (Kurve I in Fig. 2) hat sich während der

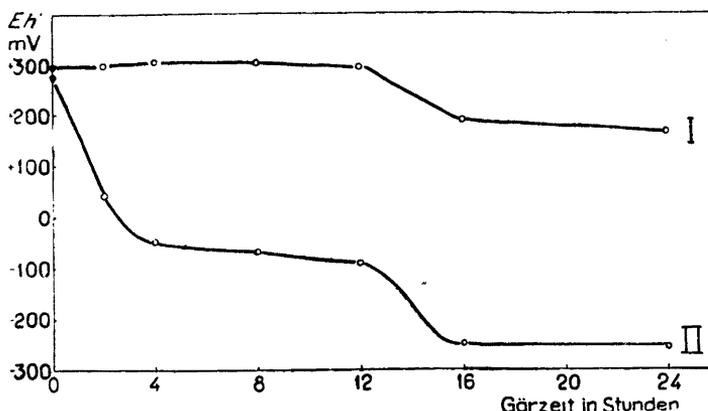


Fig. 2. Redoxpotentialkurven der in Tabelle 4 dargestellten Gärversuche. I Aerob. II Anaerob.

12 ersten Stunden der Gärung auf der ursprünglichen Höhe (etwa bei + 300 mV) gehalten. Danach ist ein ziemlich schroffer Fall um etwa 100—130 mV eingetreten.

Bei der anaeroben Gärlösung zeigt das Redoxpotential (Kurve II in Fig. 2) während der ersten 4 Stunden einen Fall um etwa 350 mV. Danach wird die Kurve flacher. Nach 12 Stunden setzt ein neuer schroffer Fall um etwa 150 mV ein. Beim Abbruch des Versuches (nach 25 Stunden) belief sich die Potentialdifferenz zwischen der aeroben und der anaeroben Gärlösung auf etwa 400 mV.

Von C_4 -Verbindungen wurde nach zweistündiger Gärung sowohl in der aeroben als in der anaeroben Gärlösung nur Acetoin gefunden. Dieser Befund spricht stark zugunsten der Auffassung, dass bei diesen Reaktionen das Acetoin vor dem Diacetyl und dem 2,3-Butylenglykol entsteht. Im weiteren Verlauf der Gärung hat sich die Menge des Acetoin in beiden Gärlösungen vermehrt, bis nach 12 Stunden ein bedeutender Rückgang zu verzeichnen ist. Letzteres in Verbindung mit einer gleichzeitigen bedeutenden Zunahme des 2,3-Butylenglykols und der Potentialfall der Gärlösungen nach der 12. Stunde erweisen, dass sowohl unter aeroben als anaeroben Bedingungen eine Reduktion von Acetoin zu 2,3-Butylenglykol stattgefunden hat.

Diacetyl wurde nach 5 Stunden in beiden Gärlösungen, jedoch bedeutend weniger als Acetoin gefunden. Danach ist seine Menge in der aeroben Gärlösung bis zum Abbruch des Versuches unverändert geblieben, in der anaeroben ist sie dagegen bis zur 12. Gärstunde, dann aber nicht mehr gestiegen.

Die Resultate dieser Versuchsreihe erweisen deutlich, dass von den C_4 -Verbindungen das Acetoin primär gebildet wird, wonach es weiter zu Diacetyl oxydiert und zu 2,3-Butylenglykol reduziert werden kann.

Gäversuche mit getrockneten Malzaromabakterien

Die getrocknete Bakterienmasse hat sich in diesen Versuchen nicht als fähig erwiesen, Glucose zu vergären, wohl aber wurden Brenztraubensäure und Acetaldehyd angegriffen. Tabelle 3 enthält die Resultate eines Versuches, bei dem Acetaldehyd als Substrat diente.

Tabelle 3. Aerobes Gärversuch mit getrockneter Bakterienmasse bei Gegenwart von Toluol und mit Acetaldehyd als Substrat. Gärzeit 84 Stunden, Temperatur 40° C, pH 5,2.

Acetaldehyd	zugesezt, mg	150
Diacetyl	gebildet, »	0,16
Acetoin	» »	0,54
2,3-Butylenglykol	» »	1,76
C ₄ -Verbindungen zusammen	» »	2,46

Die Werte lassen also erkennen, dass die getrockneten Malzaromabakterien ein Enzym oder ein Enzymsystem enthalten, das bei Gegenwart von Toluol aus Acetaldehyd C₄-Verbindungen zu synthetisieren vermag. Die Resultate des Versuches bestärken also die Auffassung, dass der Acetaldehyd als Zwischenprodukt bei der Bildung der C₄-Verbindungen durch das in Frage stehende Bakterium auftritt.

Gärversuche mit zellfreier Enzymlösung aus Malzaromabakterien

Die Oxydation des Acetoins zu Diacetyl und Reduktion zu 2,3-Butylenglykol

Folgender, in Tabelle 5 dargestellter Versuch wurde mit zellreier Enzymlösung⁴⁴ in einer Phosphatpufferlösung ausgeführt, die als Substrat Acetoin + Diacetyl enthielt.

Tabelle 5. Aerobes Gärversuch mit zellfreier Enzymlösung des Malzaromabakteriums (I) nebst Kontrolle (II). Substrate: Acetoin + Diacetyl. Gärzeit 20 Stunden, Temperatur 40° C, pH 5,6.

		I	II
Acetoin	zugesezt, mg	40,8	40,8
Diacetyl	» »	4,5	4,5
Enzymlösung	» ml	7,5	—
Während des Versuches:			
Diacetyl	vermehrt, mg	1,15	0,05
Acetoin	vermindert »	4,70	0,90
2,3-Butylenglykol	gebildet »	0,44	0

Die zellfreie Enzymlösung des Malzaromabakteriums hat in diesem Versuch Acetoin zu Diacetyl oxydiert und zu 2,3-Butylenglykol reduziert.

Die Abnahme des Acetoins während des Versuches hat jedoch die zusammengerechneten Mengen von Diacetyl und 2,3-Butylenglykol übertroffen. Das Acetoin ist demnach in der Gärlösung auch noch von andersartigen Veränderungen betroffen worden, mög-

licherweise ist es über Diacetyl durch Einwirkung der Diacetylmutase (vgl. Green, Stumpf und Zarudnaya⁵³) zu Essigsäure oxydiert worden.

Während des Versuches ist durch Einwirkung des Luftsauerstoffs in der Kontrollgärlösung (II) eine kleine Menge Acetoin zu Diacetyl (0,05 mg) oxydiert worden.

Gärversuche mit *Streptococcus paracitrovorus*

Die nachstehende Versuchsreihe wurde mit einer Bakteriensuspension von *Streptococcus paracitrovorus* unter aeroben Bedingungen mit Glucose (I) und Glucose + Acetaldehyd (II) als Substrat durchgeführt. Tab. 6 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 6. Aerober Gärversuch mit Bakteriensuspension von Streptococcus paracitrovorus. Substrate: Glucose (I) und Glucose + Acetaldehyd (II). Gärzeit 20 Stunden, Temperatur 28° C, pH 5,5.

		I	II
Glucose	zugesetzt, mg	3000	3000
Acetaldehyd (allmählich)	» »	—	302
Glucose	vergoren »	1005,0	738,0
Diacetyl	gebildet, mg	2,76	0,55
Acetoin	» »	7,31	9,25
2,3-Butylenglykol	» »	3,48	4,00
C ₄ -Verbindungen zusammen	» »	13,55	13,80

In der Gärlösung mit Glucose als ausschliessliches Substrat (I) wurden an C₄-Verbindungen 13,55 mg oder 1,4 % der vergorenen Glucose gebildet. In der Gärlösung, die ausserdem Acetaldehyd zugesetzt enthielt (II), betrugen die entsprechenden Mengen 13,80 mg oder 1,9 %. Der Acetaldehydzusatz hat also die Acetoinbildung aus der Glucose gefördert.

In Tabelle 7 sind die Resultate einer Versuchsreihe zusammengefasst, in welcher Brenztraubensäure (I), Brenztraubensäure + Acetaldehyd (II) und Acetaldehyd (III) als Substrat dienten. Der Acetaldehyd wurde den Gärlösungen während des Versuches allmählich zugesetzt.

Tabelle 7. Aerober Gärversuch mit Bakteriensuspension von Streptococcus paracitrovorus. Substrate: Brenztraubensäure (I), Brenztraubensäure + Acetaldehyd (II) und Acetaldehyd (III). Gärzeit 20 Stunden, Temperatur 28° C, pH 5,6.

		I	II	III
Brenztraubensäure	zugesetzt, mg	500	500	—
Acetaldehyd (allmählich)	» »	—	578	578
Brenztraubensäure	vergoren, »	238,0	264,4	—
Diacetyl	gebildet mg	2,39	0,58	0
Acetoin	» »	4,78	17,56	0
2,3-Butylenglykol	» »	2,39	2,89	0
C ₄ -Verbindungen zusammen	» »	9,56	21,03	0

Wie man aus den angeführten Werten ersieht, sind aus der Brenztraubensäure durch die Einwirkung von *Streptococcus paracitrovorus* C₄-Verbindungen entstanden. Acetaldehydbildung hat sich in den Gärlösungen dieses Bakteriums nicht nachweisen lassen. Dagegen hat der der gärenden Brenztraubensäure zugesetzte Acetaldehyd die Bildung der C₄-Verbindungen aus der Brenztraubensäure bedeutend stimuliert. Die Gesamtmenge der aus Brenztraubensäure als alleiniges Substrat hervorgegangenen C₄-Verbindungen entspricht nämlich 4,0 % der vergorenen Brenztraubensäure. In der Gärlösung II, in welcher der Brenztraubensäure noch Acetaldehyd zugesetzt wurde, beträgt dieser Prozentwert dagegen 7,9. Die Acetoinbildung aus der Brenztraubensäure ist also durch den Acetaldehydzusatz ganz erheblich gefördert worden. In der Gärlösung, in welcher lediglich Acetaldehyd als Substrat diente (III), liessen sich C₄-Verbindungen überhaupt nicht nachweisen.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Man ist sich im allgemeinen darüber einig, dass bei den biologischen Bildungsreaktionen von Diacetyl, Acetoin (Acetylmethylcarbinol) und 2,3-Butylenglykol Brenztraubensäure als Zwischenprodukt auftritt. Die Meinungsverschiedenheiten betreffen in erster Linie die Frage, welche von den genannten C₄-Verbindungen primär entsteht, um dann über Oxydations- und Reduktionsvorgänge in die anderen überzugehen, und auf welchen Wegen sich diese Reaktionen abspielen.

Neuberg betrachtet das Acetoin als primäres Kondensationsprodukt, an dessen Bildung bei der Hefe zwei verschiedene Enzyme beteiligt sind. Aus der Brenztraubensäure wird zunächst durch Einwirkung der Carboxylase Acetaldehyd gebildet, dessen Kondensation zu Acetoin dann von einem zweiten Enzym, der Carboligase, geleitet wird.

Das Vorhandensein der Carboligase bei diesen Reaktionen ist insbesondere von Dirscherl und Langenbeck bezweifelt worden. Ihnen gemäss würden diese Vorgänge allein schon durch die Anwesenheit der Carboxylase möglich gemacht.

Nach den Untersuchungen von Storgårds enthalten die Aromabakterien keine Carboxylase, und nach Virtanen wird in diesem Fall aus zwei Brenztraubensäuremolekülen ohne Acetaldehyd als Zwischenprodukt ein Molekül Acetoin gebildet. Dieselbe Reaktion haben auch Silverman und Werkman in zellfreier Enzymlösung von *Aerobacter aerogenes* festgestellt.

Martius ist der Ansicht, dass aus der Brenztraubensäure durch Abspaltung von Wasserstoff und Kohlendioxyd ein ketonartiges Radikal entsteht, welches sich mit dem Acetaldehyd zu Diacetyl verbindet.

In der vorliegenden Arbeit ist die Bildung von Acetoin bzw. Diacetyl sowohl bei einem Bakterium (bei dem sog. Malzaromabakterium), das mit Hilfe von Carboxylase Brenztraubensäure zu Acetaldehyd verarbeitet, als bei

einem Bakterium (*Streptococcus paracitrovorus*), dem das genannte Enzym fehlt, untersucht worden.

Sowohl in den aeroben als in den anaeroben Gärlösungen beider Bakterien wurde im allgemeinen mehr Acetoin als Diacetyl und 2,3-Butylenglykol gebildet. Bei sehr kurzen Gärzeiten konnte durchgehends nur Acetoin festgestellt werden, während sich Diacetyl und 2,3-Butylenglykol erst im weiteren Verlauf der Gärung eingefunden haben (Tabelle 4). Diese Befunde sprechen anscheinend ausserordentlich stark dafür, dass das Acetoin bei bakteriellen Gärungen vor dem Diacetyl und dem 2,3-Butylenglykol gebildet wird.

Das Acetoin wird leicht auf rein chemischem Wege zu Diacetyl oxydiert und zu 2,3-Butylenglykol reduziert; in Gärlösungen werden jene Veränderungen indessen von Enzymen geleitet (Tabelle 5).

Beide in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bakterien vermögen Glucose und Brenztraubensäure bei der Bildung von Acetoin zu verwerten. Aus Citronensäure bildet das Malzaromabakterium bedeutend mehr Acetoin als aus Glucose, bei *Streptococcus paracitrovorus* dagegen ist die Acetoinbildung aus Citronensäure fraglich (vgl. Nikkilä⁵⁴). Die beiden Bakterien unterscheiden sich voneinander auch darin, dass das Malzaromabakterium, das also Carboxylase enthält, aus dem zugesetzten Acetaldehyd Acetoin zu synthetisieren vermag, während *Streptococcus paracitrovorus* dieses Vermögen abgeht (Tabellen 1, 3 und 7). Das Auftreten von Acetaldehyd als Zwischenprodukt bei der Acetoinbildung ist somit von der Bakterienart abhängig. Ein Zusatz von Acetaldehyd zu den mit Glucose oder Brenztraubensäure beschickten Gärlösungen der beiden Bakterien hat doch in hohem Masse fördernd auf die Acetoinbildung eingewirkt (Tabellen 1, 6 und 7).

Das Malzaromabakterium ist demnach mit einem Enzym ausgerüstet, welches den Zusammenschluss von zwei Acetaldehydmolekülen zu Acetoin katalysiert. Ob bei dieser Reaktion die Carboxylase allein oder neben ihr auch die von Neuberg genannte Carboligase wirkt, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden.

Das in *Streptococcus paracitrovorus* enthaltene, von der Carboxylase abweichende Enzym (Virtanen) vermag Brenztraubensäure, aber nicht Acetaldehyd allein zur Bildung von Acetoin zu verwerten. Die fördernde Einwirkung von Zusatz des Acetaldehyds auf die Acetoinbildung aus Brenztraubensäure beruht möglicherweise darauf, dass ein Acetaldehydmolekül an die Stelle eines Brenztraubensäuremoleküls treten kann.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Bildung von Diacetyl, Acetoin (Acetylmethylcarbinol) und 2,3-Butylenglykol sowohl bei einem Bakterium (dem sog. Malzaromabakterium), das mittels der Carboxylase aus Brenztraubensäure Acetaldehyd bildet, als bei einem Bakterium (*Streptococcus paracitrovorus*), dem das genannte Enzym fehlt, untersucht. Das erstgenannte Bakterium wurde bei den Gärversuchen ausser als Suspension auch als Trockenpräparat und zellfreie Enzymlösung, *Streptococcus paracitrovorus* jedoch nur als Suspension verwendet.

Es wurde gezeigt, dass das Acetoin bei bakteriellen Gärungen vor dem Diacetyl und dem 2,3-Butylenglykol entsteht (Tabelle 4). Das primär gebildete Acetoin kann sodann zu Diacetyl oxydiert oder zu 2,3-Butylenglykol reduziert werden (Tabelle 5).

Zusatz von Acetaldehyd zu den Gärlösungen mit Glucose und Brenztraubensäure hat die bakterielle Acetoinbildung bedeutend gefördert (Tabellen 1, 6 und 7; vgl. auch Nikkilä⁵⁴).

Es konnte ferner gezeigt werden, dass Acetaldehyd als Zwischenprodukt bei den Bildungsreaktionen des Acetoin bei dem Carboxylase enthaltenden Malzaromabakterium, nicht aber bei dem jenes Enzyms entbehrenden *Streptococcus paracitrovorus* auftritt.

Auch hat sich ergeben, dass bei bakteriellen Gärungen ohne Ca-Ion keine Bildung von C₄-Verbindungen stattfindet.

Zum Schluss spreche ich dem Vorstand dieses Laboratoriums, Herrn Professor Dr. A. I. Virtanen, der mir bei meiner Arbeit mit wertvollen Ratschlägen und Anleitungen beigestanden hat, meinen besten Dank aus.

LITERATUR

1. Niel, C. van, Kluyver, A., und Derx, H. *Biochem. Z.* **210** (1929) 234.
2. Schmalfuss, H., und Barthmeyer, H. *Biochem. Z.* **216** (1929) 330.
3. Neuberg, C., und Hirsch, J. *Biochem. Z.* **115** (1921) 282.
4. Neuberg, C., und Liebermann, I. *Biochem. Z.* **121** (1921) 311.
5. Neuberg, C., und Ohle, H. *Biochem. Z.* **127** (1922) 327.
6. Neuberg, C. *Z. angew. Chem.* **35** (1922) 90.
7. Neuberg, C., und Hirsch, J. *Biochem. Z.* **128** (1922) 606.
8. Neuberg, C., und Ohle, H. *Biochem. Z.* **128** (1922) 610.
9. Neuberg, C., und May, A. v. *Biochem. Z.* **140** (1923) 299.
10. Neuberg, C., und Rosenthal, O. *Ber.* **57** (1924) 1436.
11. Neuberg, C., und Simon, E. *Biochem. Z.* **156** (1925) 374.
12. Neuberg, C., und Kobel, M. *Biochem. Z.* **160** (1925) 250.
13. Dirscherl, W. und Braun, E. *Ber.* **63** (1930) 416.

14. Dirscherl, W. *Z. physiol. Chem.* **188** (1930) 225.
15. Dirscherl, W. *Z. physiol. Chem.* **201** (1931) 47.
16. Dirscherl, W. *Z. physiol. Chem.* **201** (1931) 78.
17. Dirscherl, W. *Z. physiol. Chem.* **219** (1933) 177.
18. Langenbeck, W. *Z. angew. Chem.* **45** (1932) 97.
19. Langenbeck, W. *Ergeb. Enzymforsch.* **2** (1933) 314.
20. Langenbeck, W., Jüttemann, R., Schaefer, O., und Wrede, H. *Z. physiol. Chem.* **221** (1933) 1.
21. Langenbeck, W., Wrede, H., und Schlockermann, W. *Z. physiol. Chem.* **227** (1934) 263.
22. Langenbeck, W. In Nord und Weidenhagen, Handbuch der Enzymologie, I, Leipzig (1940) S. 325.
23. Tanko, B., und Munk, L. *Z. physiol. Chem.* **262** (1939) 144.
24. Silverman, M., und Werkman, C. H. *J. Biol. Chem.* **138** (1941) 35.
25. Beynum, J. van, und Pette, J. W. *Versl. Landb. Onderz.* **44** (1938) 207.
26. Beynum, J. van. *J. Dairy Res.* **10** (1939) 250.
27. Sjöström, G. *Svenska Mejeritidningen* **32** (1940) 397, 407.
28. Virtanen, A. I., und Tarnanen, J. *Suomen Kemistilehti B* **9** (1936) 2.
29. Virtanen, A. I. Ber. XI. Milchwirtschaftl. Weltkongress **2** (1937) 121.
30. Virtanen, A. I., und Nikkilä, O. E. *Suomen Kemistilehti B* **17** (1944) 33.
31. Virtanen, A. I., und Nikkilä, O. E. *J. Dairy Res.* **15** (1947) 89.
32. Storgårds, T. *Mejeritieteellinen Aikakauskirja* **2** (1940) 22.
33. Virtanen, A. I. *Angew. Chem.* **54** (1941) 491.
34. Green, D. E., Westerfeld, W. W., Vennesland, B., und Knox, W. E. *J. Biol. Chem.* **140** (1941) 683.
35. Gross, N. H., Wood, H. C., und Werkman, C. H. *J. Bact.* **44** (1942) 257.
36. Gross, N. H., und Werkman, C. H. *J. Bact.* **51** (1946) 576.
37. Bång, F. *Svenska Mejeritidningen* **35** (1943) 386.
38. Bång, F. *Svenska Mejeritidningen* **37** (1945) 268.
39. Martius, C. *Z. physiol. Chem.* **279** (1943) 96.
40. Suomalainen, H., und Jännes, L. *Svensk Kem. Tid.* **58** (1946) 38.
41. Myrbäck, K., Vallin, I., und Magnell, I. *Svensk Kem. Tid.* **57** (1945) 124.
42. Karström, H. In Bamann und Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung, Leipzig. (1944) S. 1244.
43. Hammer, B. W. *Dairy Bacteriology*, 2 Aufl. (1938) S. 311.
44. Kalnitsky, G., Utter, M. F., Werkman, C. H. *J. Bact.* **49** (1945) 595.
45. Kometiani, P. A. *Z. anal. Chem.* **86** (1931) 359.
46. Straub, F. B. *Z. physiol. Chem.* **244** (1936) 117.
47. Friedemann, T. E., Cotonio, M., Shaffer, P. A., und Kendall, A. J. *J. Biol. Chem.* **73** (1927) 331.
48. Lieb, H., und Zacherl, M. K. *Z. physiol. Chem.* **211** (1932) 211.
49. Rimini, E. *Z. anal. Chem.* **43** (1904) 517.
50. Block, R. J., und Bolling, D. *J. Biol. Chem.* **130** (1939) 365.
51. White, A. G. C., Krampitz, L. O., und Werkman, C. H. *Arch. Biochem.* **9** (1946) 229.
52. Kniphorst, L. C. E., und Kruisheer, C. J. *Z. Untersuch. Lebensm.* **73** (1937) 1.
53. Green, D. E., Stumpf, P. K., und Zarudnaya, K. *J. Biol. Chem.* **167** (1947) 811.
54. Nikkilä, O. E. *Ann. Acad. Sci. Fennicae Ser. A II* **27** (1947).

Eingegangen am 5. September 1947.