

Mechanismus der Variation des Verhältnisses Acetat/Lactat bei der Vergärung von Glucose durch Bifidobakterien

E. LAUER und O. KANDLER

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Teilsammlung München, und Botanisches Institut der Universität, Menzinger Str. 67, D-8000 München 19, Bundesrepublik Deutschland

Mechanism of the Variation of the Acetate/Lactate/Ratio during Glucose Fermentation by Bifidobacteria

Abstract. It is demonstrated that most strains of bifidobacteria form much more acetate and less lactic acid from glucose than is to be expected according to the breakdown of glucose via the "bifidoshunt". The analysis of isotope distribution among the fermentation products of glucose labeled in different positions showed that the excess of acetate is the result of the phosphoroclastic splitting of a part of the pyruvate arising from carbons 4, 5, and 6 of glucose. In addition to acetate (carbons 5 and 6), formate is formed from carbon 4 and some acetate is reduced to ethanol. The formation of "extra" acetate occurs mainly during the log phase and is less pronounced in resting cells. The extent of the phosphoroclastic splitting of pyruvate varies considerably among different strains even among those from the same species.

Key words: *Bifidobacterium* — Glucose-fermentation — Acetate/Lactate ratio — Isotope distribution — Phosphoroclastic splitting.

Zusammenfassung. Es wird gezeigt, daß zahlreiche Bifidobakterien im Verhältnis zu Laktat sehr viel mehr Acetat bilden, als es dem Glucoseabbau nach dem „bifidoshunt“ entspricht, wobei ein Teil des Acetats auch zu Alkohol reduziert sein kann. Die Analyse der Isotopenverteilung in Abbauprodukten positionsmarkierter Glucose zeigte, daß die zusätzlich gebildete Essigsäure aus C5 und C6 der Glucose entsteht, während die entsprechende Menge an C4 zu Ameisensäure wird. Der Abbau eines Teils des aus C4, 5, 6 entstehenden Pyruvats durch die phosphoroklastische Spaltung erfolgt vorwiegend während der logarithmischen Phase. Das Ausmaß der „Extraacetatbil-

dung“ variiert stark zwischen den einzelnen Stämmen, ist aber nicht artspezifisch.

Seit den Untersuchungen von Scardovi (1964), Scardovi u. Trovatielli (1965), De Vries et al. (1967) und Veerkamp (1969) gilt der Abbau der Glucose über die Fructose-6-P-phosphoketolase unter Bildung von 3 Mol Acetat und 2 Mol Lactat aus 2 Mol Glucose (Bifidoshunt) als charakteristisches Merkmal der Gattung *Bifidobacterium*. In vielen Fällen ist aber das Verhältnis der Gärungsprodukte stark zugunsten des Acetats verschoben. De Vries u. Stouthamer (1968) stellten in diesen Fällen die zusätzliche Bildung von Formiat und Äthanol fest und nahmen an, daß ein Teil des intermediär entstehenden Pyruvats nicht zu Lactat reduziert, sondern phosphoroklastisch zu Formiat und Acetat gespalten wird. Zum Ausgleich der Redoxbildung wird dann ein Teil des Acetats zu Äthanol reduziert.

In der vorliegenden Arbeit wird die Richtigkeit der bisher nur auf der Basis der qualitativen und quantitativen Analyse der Endprodukte aufgestellten Hypothese durch die Bestimmung der Isotopenverteilung in den Endprodukten nach Vergärung verschieden positionsmarkierter Glucose-¹⁴C überprüft und die Abhängigkeit der Beteiligung dieses Zusatzmechanismus vom Wachstumsverlauf untersucht. Außerdem wird die eventuelle Artspezifität der Benutzung dieses Zusatzweges geprüft.

MATERIAL UND METHODE

1. Organismen

Es wurden Stämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ), Teilsammlung München, verwendet. Die Herkunft weiterer Stämme geht aus der Legende zu Tabelle 1 hervor.

2. Medium und Kulturmethoden

Zur Kultivierung der Organismen diente ein modifiziertes Clostridium-Anreicherungsmedium (CAM), das pro Liter Leitungswasser 5 g gepulverten Fleischextrakt, 5 g gepulverten Hefeextract, 10 g Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein, 5 g Glucose, 3 g wasserfreies K_2HPO_4 und 1 ml Tween 80 enthielt und ein pH von 6,7 aufwies. Die Substanzen stammten von der Fa. E. Merck, Darmstadt, BRD. Unmittelbar vor der Beimpfung wurde dem Medium, wie bei Reuter (1964) beschrieben, 1% Na-Ascorbat und 0,05% Cystein als konz. Lösung zugegeben, wodurch sich die Schaffung absolut anaerober Bedingungen durch eine N_2 -Atmosphäre erübrigte. Die Bebrütung erfolgte in hoher Schicht bei 37°C.

3. Glucosevergärung durch ruhende Kulturen im Puffer

10 ml einer gut bewachsenen Bouillon wurden in 220 ml frisches Medium geimpft. Das weitere Wachstum bei 37°C wurde photometrisch bei 578 nm verfolgt. Die Zellen wurden bei Erreichen der spätlogarithmischen bzw. stationären Phase abzentrifugiert, einmal in Inkubationspuffer (0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 bzw. 5,4 mit 1% Ascorbat, 0,05% Cystein und 0,004% Bromkresolpurpur bzw. Bromkresolgrün als Indicator) gewaschen und zur Verarmung an endogenem Material 30 min lang in Puffer ohne Substrat bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 50 ml Puffer mit 2% Glucose suspendiert und unter N_2 -Spülung bei 37°C inkubiert; der pH-Wert wurde 2,5 h lang durch laufende Titration mit 1 N NaOH konstant gehalten, danach wurde die Titration eingestellt und weiter inkubiert. Während der ersten 2,5 h wurde alle 30 min eine Probe entnommen, eine weitere bei Versuchsende. Die Volumenzunahme durch Titration und die Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung während der N_2 -Begasung wurden bei der Bestimmung der Menge an Gärungsprodukten entsprechend berücksichtigt. In Vorversuchen hatten wir geklärt, daß weder Ascorbat noch Cystein verwertet werden und daß diese Zusätze keinen Einfluß auf das Verhältnis der aus 0,5% Glucose gebildeten Gärungsprodukte ausüben.

4. Glucosevergärung durch wachsende Kulturen

10 ml einer spätlogarithmischen Vorkultur wurden abzentrifugiert, die Zellen in Inkubationspuffer pH 6,5 gewaschen und anschließend in 2 ml Puffer aufgenommen. 0,2 ml dieser Zellsuspension wurden als Inoculum von 5 ml Bouillon mit 0,5% bzw. 2,0% Glucose verwendet. Die Inkubation erfolgte in Reagensgläsern mit Gummistopfenverschluß bei 37°C.

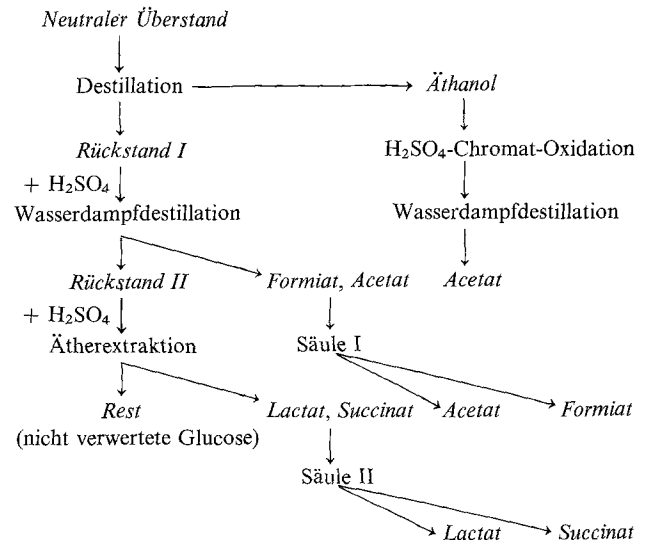
5. Vergärung von uniform- bzw. positionsmarkierter Glucose und Trennung der Gärungsprodukte

Positionsmarkierte Glucose wurde, wie oben beschrieben, in verschlossenen Reagensgläsern in Medium vergoren, uniform markierte Glucose dagegen in Warburg-Reaktionsgefäßen mit Seitenarm und Mitteleinsatz (ca. 70 ml Gesamtvolumen), um auch eine eventuelle CO_2 -Bildung zu erfassen. Im Mitteleinsatz befanden sich 0,5 ml 5%iger KOH zur Absorption von gebildetem CO_2 , die Gasphase bestand aus N_2 . Die eingesetzte Glucosemenge betrug jeweils 15 μ Mol (= 0,3%).

Spezifische Aktivitäten: 50,8 mCi/mMol Glucose-1- ^{14}C , 10,0 mCi/mMol Glucose-3- ^{14}C , 13,7 mCi/mMol Glucose-3,4- ^{14}C , 57,0 mCi/mMol Glucose-6- ^{14}C , 234,0 mCi/mMol Glucose-u- ^{14}C .

Nach Beendigung der Gärung und vor dem Abzentrifugieren der Zellen wurden unmarkierte Trägersubstanzen der zu erwartenden

den Produkte zugesetzt (0,3 mMol L-Lactat, Acetat, Formiat, Succinat und 0,19 mMol Äthanol). Die abzentrifugierten Zellen wurden 2mal in destilliertem Wasser gewaschen und deren Radioaktivität in unendlich dünner Schicht bestimmt. Überstand und Washwasser wurden mit NaOH neutralisiert und in einen Spitzkolben überführt. Die Trennung der Gärungsprodukte erfolgte in Anlehnungen an Neish (1952) gemäß folgendem Schema:



Etwa drei Viertel des Volumens des neutralen Überstandes wurde abdestilliert. Das Destillat wurde in einer verdünnten, chromatogeesättigten Chromschwefelsäure aufgefangen und bei Zimmertemperatur 45 min stehen gelassen. Das zu Acetat oxidierte Äthanol wurde mit Hilfe einer fraktionierten Wasserdampfdestillation isoliert (Wiesenberg, 1948).

Der Rückstand I wurde mit 1 ml N H_2SO_4 angesäuert und ebenfalls einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Im Destillat wurden die Säuren mit 0,1 N Natronlauge titriert.

Der Rückstand II wurde mit H_2SO_4 auf pH 1 angesäuert und einer 36stündigen, kontinuierlichen Ätherextraktion unterworfen, die neutralisierten Säuren der verschiedenen Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedunstet und in 2 ml H_2O wieder gelöst. Ein Aliquot diente zur Messung der Radioaktivität.

6. Säulenchromatographische Trennung der Säuren

Es wurde das von Varner (1957) beschriebene Verfahren benutzt. Zur Entsalzung der zu trennenden Säuren wurde eine Schicht aus 0,5 g $CHCl_3$ -gewaschenem Dowex H^+ auf die Säulen aufgesetzt. Die Salze der zu trennenden Säuren wurden in einem Volumen von etwa 1 ml H_2O aufgetragen.

a) Säule I. Zur Trennung von Formiat und Acetat wurden folgende Laufmittel verwendet (Stufengradienten):

für Acetat: H_2O -ges. $CHCl_3$: Butanol = 97,5 : 2,5;

für Formiat: H_2O -ges. $CHCl_3$: Butanol = 92,5 : 7,5.

Pro Fraktion wurden 400 Tropfen gesammelt und mit 0,1 N NaOH titriert (Phenolphthalein). Nach quantitativer Elution der ersten Säure (Acetat) wurde das Laufmittel gewechselt.

b) Säule II. Zur Trennung von Lactat und Succinat diente das Gemisch Benzol/Butanol = 80:20. Pro Fraktion wurden 90 Tropfen gesammelt.

Tabelle 1. Übersicht über die Bildung von Acetat und Lactat durch verschiedene Stämme der Gattung *Bifidobacterium* nach dem Wachstum in 2 verschiedenen Glucosekonzentrationen

Stamm	Glucosekonzentration im Medium					
	0,5%			2,0%		
	Produkt ($\mu\text{M}/\text{ml}$)		Acetat/ Lactat	Produkt ($\mu\text{M}/\text{ml}$)		Acetat/ Lactat
	Acetat	Lactat		Acetat	Lactat	
<i>B. bifidum</i>						
DSM 20082	8,3	1,0	8,3	11,9	1,2	10,0
DSM 20215	17,1	2,7	6,4	17,7	2,6	6,8
Sl 1 a ^a	17,5	5,2	3,4	23,4	7,0	3,3
<i>B. longum</i>						
DSM 20219	41,3	15,0	2,8	42,2	32,7	1,3
W 1 ^a	34,8	12,1	2,9	35,8	24,7	1,5
W 2 ^a	41,5	14,5	2,9	40,0	21,5	1,8
W 5 ^a	35,3	10,0	3,5	49,0	12,5	3,9
Bs 9 M ^a	37,2	21,7	1,7	30,8	24,7	1,3
F 2 M ^a	31,5	14,9	2,1	40,3	24,0	1,7
<i>B. adolescentis</i>						
DSM 20083	28,1	14,8	1,9	52,5	30,9	1,7
DSM 20084	9,5	6,1	1,6	17,8	9,1	2,0
DSM 20087	22,3	14,7	1,5	25,3	22,7	1,1
Ms 1 ^a	17,1	5,1	3,4	18,6	7,8	2,4
St 1 ^a	18,2	14,3	1,3	24,3	17,0	1,4
F 1 ^a	29,2	15,4	1,9	40,7	28,9	1,4
St 5 ^a	40,7	12,2	3,3	44,0	24,8	1,8
St 1 M ^a	31,5	13,7	2,3	59,0	21,7	2,7
St 7 ^a	43,3	13,2	3,3	46,3	30,0	1,5
DSM 20086	20,0	1,2	16,8	24,2	1,6	15,1
<i>B. pseudolongum</i>						
DSM 20099	26,2	6,2	4,2	34,0	15,1	2,3
DSM 20092	36,6	10,1	3,7	37,2	21,4	1,7
DSM 20085	6,4	0,7	8,8	8,0	1,0	8,1
<i>B. thermophilum</i>						
DSM 20210	22,7	17,1	1,3	33,7	22,2	1,5
14-44 ^b	20,9	18,1	1,2	39,2	17,1	2,3
P 16-6 ^b	45,5	12,7	3,6	43,6	33,8	1,3
Nissin ^b	23,4	18,5	1,3	36,3	24,7	1,5
DSM 20209	21,4	15,7	1,4	28,0	26,6	1,1
<i>B. animalis</i>						
DSM 20104	20,3	7,6	2,7	26,8	14,3	1,9
DSM 20105	24,7	8,5	2,9	22,6	12,2	1,9
DSM 20217	21,0	2,7	7,8	27,1	9,1	3,0

^a Eigenisolate aus dem Darm des Menschen

^b Isolate aus dem Darm des Schweins, erhalten von T. Mitsuoka, Institut für Physikalische und Chemische Forschungen, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokio, Japan

Die Fraktionen beider Säulen wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt, in einem bekannten Volumen H₂O gelöst und die Radioaktivität bestimmt.

7. Messung der Radioaktivität

Zur Bestimmung der Radioaktivität im CO₂ (absorbiert in KOH), in den Bakterien und in den Säuren diente ein Methandurchflußzählrohr der Fa. Fricseke & Höpfner, Erlangen. Die Messung er-

folgte in unendlich dünner Schicht auf Aluminiumplättchen mit 6 cm Durchmesser. KOH-Carbonat-Lösungen wurden dagegen auf Kupferplättchen ausgestrichen und sofort gemessen.

8. Enzymatische Bestimmung von Glucose und Gärungsprodukten

Glucose wurde nach der bei Bergmeyer et al. (1970) beschriebenen Methode, Acetat nach Holz u. Bergmeyer (1970), L-Lactat nach

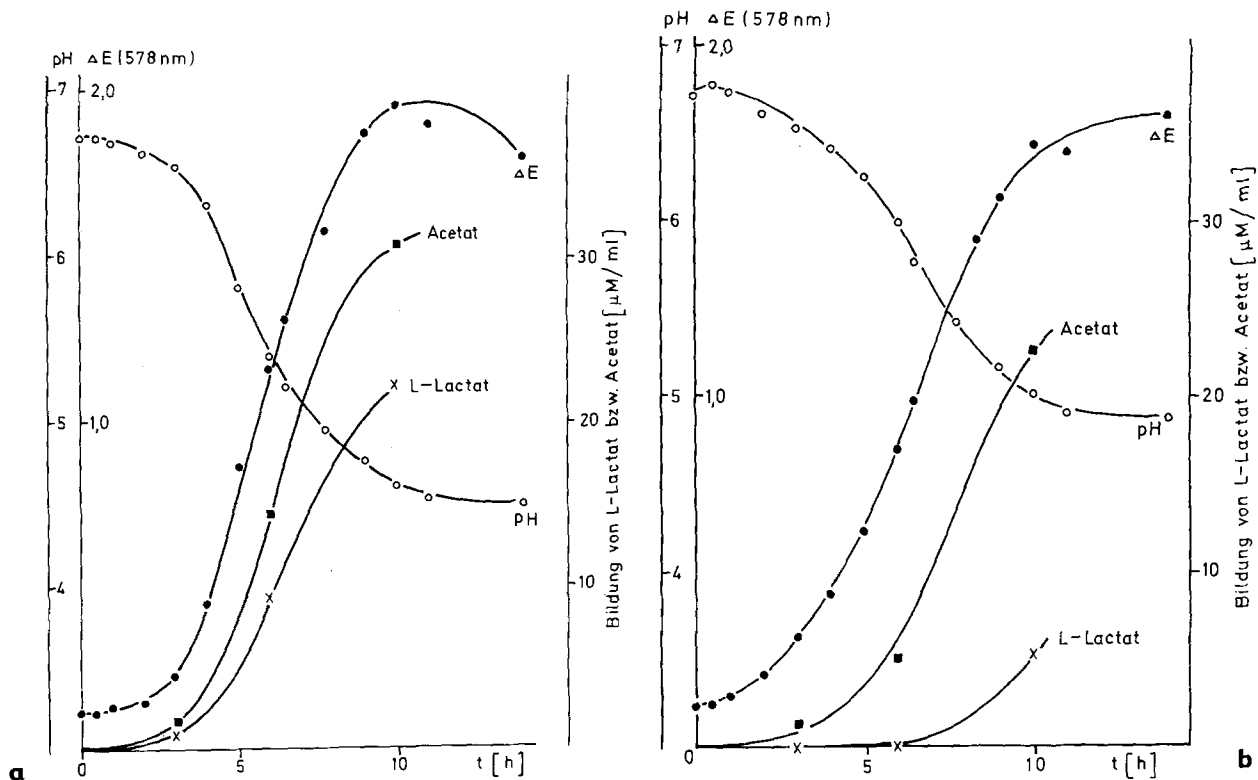


Abb. 1 a u. b. Verlauf der Acetat- und Lactatbildung sowie der pH-Veränderung während des Wachstums. (a) *B. adolescentis* DSM 20083. (b) *B. pseudolongum* DSM 20099

Hohorst (1970) und Äthanol nach Bernt u. Gutmann (1970) bestimmt. Die erforderlichen Testenzyme waren Produkte der Fa. Boehringer, Mannheim, BRD.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Variation des Acetat/Lactat-Verhältnisses innerhalb der Gattung

32 Stämme aus 6 Arten wurden mit geringer (0,5%) oder hoher (2%) Glucosekonzentration kultiviert und nach 48 h die Menge an Acetat und L-Lactat enzymatisch bestimmt.

Wie Tabelle 1 zeigt, schwanken die Werte für den Quotienten Acetat/Lactat in einem weiten Bereich zwischen 1,1 und 16,8, wobei sich in keinem Fall die Stämme einer Art als völlig einheitlich erweisen. Es besteht aber eine gewisse Korrelation zwischen der Menge an Gärungsprodukten und der Höhe des Quotienten. Dies wird besonders beim Vergleich der Ergebnisse der beiden Reihen mit verschiedenen Glucosekonzentrationen deutlich. Die höheren Quotienten findet man in der Regel bei der geringeren Glucosekonzentration, die, wie die niedrigeren Gesamtmengen an Gärungsprodukten zeigen, in den meisten Fällen wachstumsbegrenzend war. Andererseits treten aber auch bei gleichen Gesamtmengen an

Gärungsprodukten unterschiedliche Quotienten auf. Dies zeigt, daß der Quotient sowohl von der Art des Stammes als auch von der Substratversorgung bzw. vom Entwicklungszustand abhängig ist.

2. Abhängigkeit des Quotienten Acetat/Lactat vom Wachstumsverlauf

Bei 2 Stämmen, deren Quotienten in Vorversuchen regelmäßig über bzw. unter 2,0 lagen, wurde die Acetat- und Lactatbildung während des Wachstums verfolgt. Wie Abbildung 1a u. b zeigt, erfolgt bei *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 die Bildung von Acetat und Lactat im Verhältnis von etwa 3:2, während bei *B. pseudolongum* DSM 20099 anfangs praktisch nur Acetat gebildet wird und die Lactatbildung erst gegen Ende des logarithmischen Wachstums einsetzt.

Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses der Gärungsbedingungen auf das Ausmaß zusätzlicher Acetatbildung wurden die Acetat- und Lactatbildung in verschiedenen Intervallen des Wachstums und bei der anschließenden Vergärung von Glucose in Pufferlösungen, also im nicht wachsenden Zustand der Zellen, untersucht.

Wie Tabelle 2 zeigt, ergaben die nach 5 und 6 h bzw. 6 und 8 h, also während der logarithmischen

Tabelle 2. Bildung von Acetat und Lactat durch *B. adolescentis* DSM 20083 und *B. pseudolongum* DMS 20099 während des Wachstums und durch ruhende Zellen bei der Vergärung von Glucose in Puffer

Art	Wachstumsphase	Probe	Gärung der Zellen im	Inkubationsdauer (h)	pH	Acetat	Lactat	Acetat/ Lactat	Δ Acetat/ Δ Lactat ^a	
						(µM/ml)				
<i>B. adolescentis</i>	stationär	a	Medium	13,5	4,51	40,7	30,6	1,3	—	
				15,5	4,36	50,0	34,2	1,5	2,6	
				Puffer pH 6,5	2,3 19,3	6,48 4,92	49,2 115,0	36,4 74,7	1,4 1,5	— 1,7
		logarithmisch	b	Medium	5,0	5,43	11,0	8,1	1,4	—
					6,0	5,13	15,8	11,6	1,4	1,4
					Puffer pH 6,5	0,7 2,0 15,0	6,45 6,48 4,84	7,6 24,6 84,0	5,5 15,3 42,7	1,4 1,6 2,0
	logarithmisch	c	Medium	6,0	5,83	5,5	3,4	1,6	—	
				8,0	5,05	11,1	7,6	1,5	1,3	
				Puffer pH 5,4	0,5 2,5 14,0	5,25 5,35 4,38	4,0 19,3 63,7	3,3 12,8 39,0	1,2 1,5 1,6	— 1,6 1,7
	<i>B. pseudolongum</i>	logarithmisch	a	Medium	6,0	5,71	7,4	0,5	14,8	—
					7,0	5,38	9,8	1,4	7,0	2,7
					Puffer pH 6,5	1,0 2,5 16,0	6,48 6,48 4,82	8,6 23,2 71,2	4,3 11,2 39,8	2,0 2,1 1,8
logarithmisch			b	Medium	5,6	5,41	9,6	1,04	9,2	—
					6,0	5,35	10,6	1,45	7,3	2,5
					Puffer pH 5,4	1,0 2,5 15,5	5,33 5,38 4,43	6,2 16,6 53,8	4,6 12,4 38,2	1,3 1,3 1,4

^a Differenzwerte zwischen der 1. und 2. bzw. 2. und 3. Probenahme

Phase geernteten Zellen von *B. adolescentis*, Quotienten nahe an 1,5, während die Quotienten im Falle von *B. pseudolongum* in den ersten Stunden des Wachstums bei 10 und auch im letzten Intervall noch bei 2,5 lagen. Bei der anschließenden Vergärung in Puffer wurde der pH während der beiden ersten Perioden durch Rücktitration weitgehend auf dem Ausgangswert von 6,5 bzw. 5,4 gehalten, während er in der letzten wesentlich längeren Periode unter 5,0 absank. Im Falle von *B. adolescentis* ergaben sich auch bei der Gärung der ruhenden Kulturen Quotienten nahe 1,5, wobei die Gärung bei pH 6,5 geringfügig höhere Quotienten lieferte als die bei 5,4. Deutlicher war dieser pH-Einfluß bei *B. pseudolongum*, der bei pH 6,5 Quotienten von rd. 2,0, bei pH 5,4 dagegen nur von 1,3 erreichte. Diese Verschiebung beruht ausschließlich auf einer Hemmung der Acetatbildung, während die entstandene Milchsäuremenge bei beiden pH-Werten gleich war. Bei ruhenden Kulturen unterdrückt

demnach ein niedrigerer pH-Wert die zusätzliche Acetatbildung.

3. Die Verteilung der ¹⁴C-Markierung auf die Gärungsprodukte nach Wachstum mit positionsmarkierter Glucose

Zur direkten Prüfung der Frage, ob im Falle von *B. pseudolongum* eine phosphoroklastische Spaltung intermediär entstehenden Pyruvats stattfindet, ließen wir diesen Stamm mit ¹⁴C-positionsmarkierter Glucose (0,3%) wachsen. Als Inoculum diente eine frisch bereitete Suspension spätlogarithmischer Zellen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter anaeroben Bedingungen.

Tabelle 3 enthält neben der Verteilung des ¹⁴C auf die Gärungsprodukte auch den tatsächlich vergorenen Anteil der Glucose, der sich nach Abzug der in den Zellen und im Rückstand nach Ätherextraktion ver-

Tabelle 3. Prozentuale Verteilung des ^{14}C bei Vergärung positionsmarkierter Glucose durch *B. pseudolongum* DSM 20099

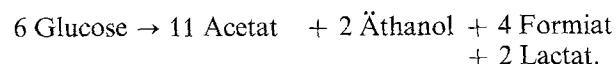
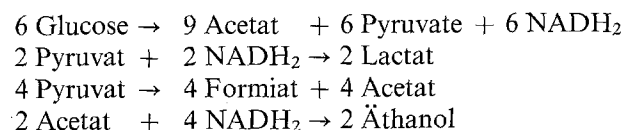
Fraktion	Glucose-				
	U- ^{14}C	1- ^{14}C	3- ^{14}C	3,4- ^{14}C	6- ^{14}C
Zellen	3,2	4,1	6,7	7,2	8,4
Rückstand nach Ätherextraktion (unvergorene Glucose)	14,9	3,5	9,9	7,7	7,3
vergorene Glucose (Gärungsprodukte)	81,9	92,4	83,4	85,1	84,3
Gärungsprodukte in Prozent (vergorene Glucose = 100)					
CO ₂	0,3	—	—	—	—
Formiat	10,6	0,6	0,3	40,2	0,8
Äthanol	9,8	9,1	13,1	3,4	14,8
Acetat	60,0	87,7	84,8	45,6	65,7
L-Lactat	18,3	2,0	1,8	10,2	18,1
Succinat	1,0	0,3	0	0,5	0,6

bliebenen Radioaktivität von der insgesamt eingesetzten Markierung ergibt. Der nicht mit Äther extrahierbare, radioaktive Anteil des Rückstandes ist vermutlich auf Kapselschleime und freie unvergorene Glucose zurückzuführen.

Die Ergebnisse mit uniform markierter Glucose zeigen die Verhältnisse der gebildeten Gärungsprodukte zueinander. Demnach entsteht als C-1-Verbindung nur Formiat, aber praktisch kein CO₂. Succinat tritt nur in Spuren auf. Es wird vermutlich durch CO₂-Fixierung über eine der Wood-Werkman-Reaktionen mit anschließender Reduktion gebildet, wie Versuche mit $^{14}\text{CO}_2$ zeigten (Pine u. Howell, 1956). Äthanol wird dagegen neben Lactat und Acetat in erheblichen Mengen gebildet. Es entsteht wie Acetat aus allen Positionen mit Ausnahme von C-4, wie ein Vergleich der Daten der Tabelle 3 ergibt. Dagegen wird Formiat nur aus C-4 und Lactat nur aus C-4,5,6 gebildet. Die geringen „falschen“ Markierungen, z. B. die geringe Markierung in Lactat aus Glucose-1- ^{14}C usw. kommen wahrscheinlich dadurch zustande, daß durch Transaldolase- und Transketolasereaktionen eine geringfügige Umgruppierung der C-Atome auf dem Niveau der Zuckerphosphate erfolgt, so daß die Isotopenverteilung in dem zur Spaltung gelangenden Fructose-6-Phosphat nicht mehr vollständig mit der in der zugesetzten Hexose identisch ist. Solche Umgruppierungen sind von Pflanzen in erheblich stärkerem Ausmaß (Kandler u. Gibbs, 1959; Maclachlan u. Porter, 1959, 1961) seit langem bekannt und wurden kürzlich auch bei *Cellulomonas* sehr ausgeprägt gefunden (Stackebrandt, 1974). Tabelle 3 zeigt ferner, daß Äthanol aus C-1, C-3 und C-6 in etwa gleichen Prozentsätzen entsteht. Dies beweist, daß das reduzierte Acetat aus einem einheitlichen Pool stammt, und weder eine Kompartimentierung des auf verschiedenen Wegen entstandenen Acetats vorliegt, noch eine

Reduktion des bei der Pyruvatspaltung entstehenden Acetats an einem Multienzymkomplex erfolgt.

Die in Tabelle 3 enthaltenen Daten über die Isotopenverteilung auf die Gärungsprodukte sind nur verständlich, wenn neben der Spaltung des Fructose-6-Phosphats durch die Phosphoketolase auch noch eine phosphoroklastische Spaltung des Pyruvats zu Formiat und Acetat erfolgt, und ein Teil des Acetats zu Alkohol reduziert wird, wie es von De Vries u. Stouthamer (1968) postuliert wurde. Die gefundene quantitative Isotopenverteilung ist mit folgender Reaktionsfolge vereinbar:



LITERATUR

- Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Schmidt, F., Stork, H.: D-Glucose-Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. 2, 2. Aufl. (H. U. Bergmeyer, Hrsg.), S. 1163–1168. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1970
- Bernt, E., Gutmann, I.: Äthanol-Bestimmung mit Alkohol-Dehydrogenase und NAD. In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. 2, 2. Aufl. (H. U. Bergmeyer, Hrsg.), S. 1457–1460. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1970
- Hohorst, H. J.: L-(+)-Lactat-Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD. In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. 2, 2. Aufl. (H. U. Bergmeyer, Hrsg.), S. 1425–1429. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1970
- Holz, G., Bergmeyer, H. U.: Acetat-Bestimmung mit Acetatkinase und Hydroxylamin. In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. 2, 2. Aufl. (H. U. Bergmeyer, Hrsg.), S. 1486–1490. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1970

- Kandler, O., Gibbs, M.: Untersuchungen über den Einfluß der Photosynthese auf die Austauschvorgänge innerhalb des Hexosemoleküls. *Z. Naturforsch.* **14b**, 8–13 (1959).
- Maclachlan, G. A., Porter, H. K.: Replacement of oxidation by light as the energy source for glucose metabolism in tobacco leaf. *Proc. roy. Soc.* **B150**, 460–473 (1959)
- Maclachlan, G. A., Porter, H. K.: Metabolism of glucose carbon atoms by tobacco leaf disks. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* **46**, 244–259 (1961)
- Neish, A. C.: Analytical methods for bacterial fermentations. National Research Council of Canada, 46-8-3, Saskatoon, pp. 1–18 (1952)
- Pine, L., Howell, H.: Comparison of the physiological and biochemical characters of *Actinomyces* species with those of *Lactobacillus*. *J. gen. Microbiol.* **15**, 428–445 (1956)
- Reuter, G.: Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora in Säuglings- und Erwachsenenstuhl. *Bakt., I. Abt. Orig.* **191**, 486–507 (1964)
- Scardovi, V.: Studies in rumen bacteriology. IV. The formation of acetate through phosphorolytic cleavage of fructose-6-phosphate in a group of branched Grampositive bacteria isolated from sheep rumen. *Ann. Microbiol.* **14**, 189–198 (1964)
- Scardovi, V., Trovatelli, L. D.: The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.* **15**, 19–29 (1965)
- Stackebrandt, E.: Biochemisch-taxonomische Untersuchungen an der Gattung *Cellulomonas*. Dissertation, Universität München (1974)
- Varner, J. E.: Chromatographic analysis of organic acids. In: *Methods in enzymology*, Vol. 3, 1st ed. (S. P. Colowick, N. O. Kaplan, eds.), pp. 397–402. New York: Academic Press 1957
- Veerkamp, J. H.: Catabolism of glucose and derivatives of 2-deoxy-2-amino-glucose in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **129**, 257–263 (1969)
- Vries, W. de, Gerbrandy, S. J., Stouthamer, A. H.: Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **136**, 415–425 (1967)
- Vries, W. de, Stouthamer, A. H.: Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by bifidobacteria. *J. Bact.* **96**, 472–478 (1968)
- Wiesenberg, E.: Die mikroanalytische Bestimmung von C-Methyl- und Acetylgruppen. *Mikrochemie* **33**, 51 (1948)

Eingegangen am 10. März 1976