

Prom. Nr. 3625

B.

Diss ETH

# Untersuchungen zu Systematik und Stoffwechsel der Essigsäurebakterien

Von der  
**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE IN ZÜRICH**  
zur Erlangung  
der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften  
genehmigte  
**PROMOTIONSARBEIT**

Vorgelegt von  
**Thomas Leisinger**  
dipl. Ing.-Agr. ETH  
von Davos (GR)

Referent: Herr Professor Dr. L. ETTLINGER

Korreferent: Herr Professor Dr. C. MARTIUS



Buchdruckerei F. Mitzlaff KG / Rudolstadt (Thür.)

1965

Abdruck aus

**Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten  
und Hygiene, Bd. 119, 1965**

**Zweite - naturwissenschaftliche - Abteilung**  
Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie

Herausgegeben von

**Prof. Dr. Richard Koch, Prof. Dr. Georg Müller und Oberregierungsrat Dr. C. Stapp**

**VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA**

Satz und Druck: Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt

Printed in Germany

Veröffentlicht unter der Lizenz-Nr. 1063

Prom. Nr. 3625

# Untersuchungen zu Systematik und Stoffwechsel der Essigsäurebakterien

Von der  
**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE IN ZÜRICH**  
zur Erlangung  
der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften  
genehmigte  
**PROMOTIONSARBEIT**

Vorgelegt von  
**Thomas Leisinger**  
dipl. Ing.-Agr. ETH  
von Davos (GR)

Referent: Herr Professor Dr. L. ETTLINGER

Korreferent: Herr Professor Dr. C. MARTIUS

**Buchdruckerei F. Mitzlaff KG / Rudolstadt (Thür.)**

1965

*Meinem Vater*

# Inhaltsverzeichnis

Einleitung .....	329
A. Wachstumsversuche .....	333
I. Material und Methoden .....	334
1. Organismen .....	334
2. Aufbewahrung der Stämme .....	336
3. Nährlösungen für die Wachstumsversuche .....	336
4. Kulturbedingungen .....	337
5. Impfmateriäl .....	337
6. Bestimmung des Wachstums .....	339
II. Ergebnisse .....	339
1. Kohlenstoffernährung .....	329
2. Stickstoff- und Wuchsstoffernährung .....	339
3. Einfluß von Hefeextrakt auf die Verwertung von Äthanol .....	339
4. Variabilität der Eigenschaften .....	345
B. Stoffwechseluntersuchungen .....	346
I. Material und Methoden .....	347
1. Gewinnung von Zellmaterial .....	347
2. Herstellung zellfreier Extrakte .....	348
3. Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	349
a) Bestimmung der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus .....	349
— Isocitratase .....	349
— Malatsynthetase .....	349
b) Enzyme der Glucoseverwertung .....	349
— Glucokinase und Gluconokinase .....	349
— Fructose-6-Phosphat-Kinase .....	350
— Fructose-1,6-Phosphat-Aldolase .....	351
— Enzyme des Glucoseabbaus nach Entner-Doudoroff .....	351
4. Manometrische Untersuchungen .....	351
5. Chemische Bestimmungen .....	351
a) Zitronensäurebestimmung .....	351
b) Stickstoffbestimmung .....	351
c) Proteinbestimmung .....	351
6. Versuche mit Äthanol- <sup>14</sup> C .....	351
II. Ergebnisse .....	352
1. Die Verwertung von Äthanol .....	352
2. Die Verwertung von Glucose .....	357
a) Die verschiedenen Abbauege der Glucose .....	357
b) Die Primärreaktionen der Glucose .....	358
— Phosphorylierungsreaktionen .....	358
— Permeabilität .....	366
C. Diskussion .....	366
I. Systematik der Essigsäurebakterien .....	366
II. Probleme des Stoffwechsels der Essigsäurebakterien .....	369
D. Zusammenfassung .....	373
Literatur .....	375

# Untersuchungen zu Systematik und Stoffwechsel der Essigsäurebakterien

Thomas Leisinger

Mit 8 Abbildungen im Text

## Einleitung

Zu den Essigsäurebakterien gehören alle Bakterien, die imstande sind, in saurem Milieu aus Äthanol Essigsäure zu bilden. Bis vor zehn Jahren galten diese Mikroorganismen als eine einheitliche Gruppe. Sie wurden in der Gattung *Acetobacter* Beijerinck zusammengefaßt. Mit der Entdeckung zweier verschiedener Begeißelungstypen bei Essigsäurebakterien durch LEIFSON (1954) wurde die Einheit der Gattung *Acetobacter* Beijerinck in Frage gestellt. Bewegliche, zur Oxydation von Essigsäure befähigte Stämme (überoxydierende Stämme) wurden von LEIFSON als peritrich begeißelt erkannt. Bei beweglichen, Essigsäure nicht oxydierenden Stämmen fand er dagegen stets polare Begeißelung. LEIFSON schlug daher vor, polar begeißelte oder unbegeißelte, nicht überoxydierende Stämme in der neuen Gattung *Acetomonas* zusammenzufassen. Die überoxydierenden, peritrich begeißelten Stämme verblieben in der Gattung *Acetobacter*. Die Gattung *Acetomonas* wird in die Familie der *Pseudomonaceae* eingeordnet, während die neu definierte Gattung *Acetobacter* wegen ihrer peritrichen Begeißelung aus der Ordnung der *Pseudomonadales* entfernt werden muß.

Die Frage, ob Essigsäurebakterien in eine oder gemäß LEIFSON (1954) in zwei Gattungen eingeteilt werden sollen, nimmt in der Diskussion um Systematik und Nomenklatur der Essigsäurebakterien eine zentrale Stellung ein. SHIMWELL (1958, 1959) und SHIMWELL u. CARR (1959) nahmen den Vorschlag von LEIFSON auf. Sie prüften die Begeißelung weiterer Stämme in licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen und stellten wie LEIFSON eine Korrelation zwischen polarer Begeißelung und Unfähigkeit zur Überoxydation sowie zwischen peritricher Begeißelung und Fähigkeit, Essigsäure zu oxydieren, fest. Sie gelangten ebenfalls zur Ansicht, daß innerhalb der Essigsäurebakterien scharf zwischen diesen beiden Gruppen zu unterscheiden sei, denen sie Gattungsrang zuerkennen und die sie gemäß den Grundsätzen und Regeln des internationalen bakteriologischen Nomenklaturkodex (BUCHANAN, ST. JOHN-BROOKS u. BREED, 1948) neu definieren [*Acetobacter*: SHIMWELL (1959), *Acetomonas*: SHIMWELL u. CARR (1959)].

Im Gegensatz dazu vertritt DE LEY (1961) die Auffassung, bei Essigsäurebakterien könne keine scharfe Grenze zwischen peritricher und polarer Begeißelung gezogen werden. In einer Arbeit von ASAI u. SHODA (1958) waren nämlich vermeintlich polar begeißelte, Essigsäure oxydierende Stämme (*Gluconobacter liquefaciens* Stamm G 1, *Gluconobacter melanogenus* Stamm AC-8 und *Gluconobacter melanogenus* Stamm U 4) beschrieben worden. Solche Organismen würden, wenn es sie gäbe, Übergangsformen zwischen den Gattungen *Acetomonas* und *Acetobacter* darstellen. Die Annahme ihrer Existenz bewog DE LEY (1961) dazu, den Vorschlag von LEIFSON abzulehnen.

In der Folge wurde jedoch von SHIMWELL u. CARR (1959), von HODGKISS, SHIMWELL u. CARR (1962) sowie von KIMMIT u. LE B. WILLIAMS (1963) gezeigt, daß die vermeintlich polar begeißelten, überoxydierenden Stämme von Essigsäurebakterien in Wirklichkeit peritrich begeißelt waren. Das wichtigste Argument gegen die von LEIFSON vorgeschlagene Einteilung der Essigsäurebakterien in zwei Gattungen, *Acetobacter* und *Acetomonas*, wurde damit widerlegt.

Polar begeißelte Essigsäurebakterien unterscheiden sich von peritrich begeißelten noch in anderen Eigenschaften. So stellten JOUBERT et al. (1961) fest, daß polar begeißelte, Essigsäure nicht oxydierende Stämme unfähig sind, Aminosäuren zu oxydieren, zu desaminieren oder zu assimilieren; peritrich begeißelte, überoxydierende Stämme hingegen oxydieren l-Alanin. Serologische Untersuchungen von MCINTOSH (1962) lassen die polar begeißelten Essigsäurebakterien als eine in sich geschlossenen Einheit erscheinen. Dies alles spricht für eine Unterteilung der Essigsäurebakterien in zwei Gattungen.

Damit erhebt sich die Frage nach der korrekten Benennung der beiden Gattungen von Essigsäurebakterien. ASAI (1935) war schon lange vor dem Vorschlag LEIFSONS für die Errichtung von zwei Gattungen eingetreten. Er unterschied zwischen der Gattung *Gluconobacter* mit starkem Gluconsäurebildungsvermögen, jedoch schwacher oder fehlender Fähigkeit zur Essigsäurebildung und der Gattung *Acetobacter*, die sich durch starke Essigsäurebildung und schwache oder fehlende Gluconsäurebildung charakterisieren ließ. Das morphologische Merkmal der Begeißelung war von ASAI in der ursprünglichen Beschreibung der Gattungen nicht verwendet worden.

Nachdem LEIFSON (1954) das Vorkommen von polarer und peritricher Begeißelung bei Essigsäurebakterien gezeigt hatte, nahmen ASAI u. SHODA (1958) eine ausführliche morphologische und physiologische Untersuchung an zahlreichen Stämmen vor. Sie unterstützten die Trennung in die Gattungen *Gluconobacter* und *Acetobacter* durch weitere biochemische Merkmale. Als zusätzliche Merkmale zur Unterscheidung der beiden Gattungen wurden verwendet: Die Fähigkeit, Essigsäure oder Milchsäure zu oxydieren, die Oxydation von Polyalkoholen und die Bildung von Substanzen, die mit  $\text{FeCl}_3$  eine Farbreaktion geben. Ferner stellten sie fest, daß *Gluconobacter*-Stämme polar, *Acetobacter*-Stämme peritrich begeißelt waren und meldeten aus diesem Grunde Priorität an gegenüber dem Vorschlag von LEIFSON, der auf Unterteilung der Essigsäurebakterien in die Gattungen *Acetobacter* und *Acetomonas* lautete. Nach Auffassung von ASAI u. SHODA ist die Gattungsbezeichnung *Acetomonas* Leifson (1954) ein späteres Synonym zu *Gluconobacter* ASAI (1935).

Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre (SHIMWELL, CARR u. RHODES, 1960; SHIMWELL u. CARR, 1959; STOUTHAMER, 1960; KIMMIT u. LE B. WILLIAMS, 1963) haben gezeigt, daß die von LEIFSON vorgeschlagene Definition der beiden Gattungen, obwohl sie nur den Begeißelungstyp und die Fähigkeit zur Oxydation von Essigsäure als trennende Merkmale verwendet, den tatsächlichen Verhältnissen gerecht wird, indem sie in allen bekannten Fällen eine eindeutige Zuordnung gestattet.

Die von ASAI u. SHODA (1958) gegebene Beschreibung der Gattung *Gluconobacter* gibt hingegen weder eine klare Abgrenzung gegenüber *Pseudomonas* noch gegenüber *Acetobacter*. So umfaßt die Gattung *Gluconobacter* durch Einbeziehung von Stämmen, die unfähig sind, Äthanol zu Essigsäure zu oxydieren, auch *Pseudomonas*-Arten, die nicht zu den Essigsäurebakterien gehören. Die Verwischung der Grenze zwischen den Gattungen *Gluconobacter* und *Acetobacter* kommt dadurch zustande, daß diese Autoren, wie schon erwähnt, vermeintlich polar begeißelte, Essigsäure oxydierende Stämme gefunden haben, was sie dazu veranlaßte, in die Gattung

*Gluconobacter* sowohl überoxydierende als auch zur Oxydation von Essigsäure unfähige Stämme aufzunehmen. Die Existenz von polar begeißelten, überoxydierenden Stämmen konnte jedoch nicht bestätigt werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von HODGKISS, SHIMWELL u. CARR (1962) und von KIMMIT u. Le B. WILLIAMS (1963) zeigten, daß die fraglichen Stämme peritrich begeißelt und daher in die Gattung *Acetobacter* einzuordnen sind.

Nach den heutigen Kenntnissen umfaßt daher die Gattung *Gluconobacter*, gemäß der Beschreibung von ASAI u. SHODA (1958), Vertreter der drei Gattungen *Pseudomonas*, *Acetomonas* und *Acetobacter*. Aus diesem Grunde muß in Zukunft von der Verwendung der Gattung *Gluconobacter* abgesehen werden.

In seiner grundlegenden Arbeit über die Begeißelung der Essigsäurebakterien hatte LEIFSON (1954) die Gattung *Acetomonas* als polar, multitrich begeißelt beschrieben. SHIMWELL (1958) entdeckte jedoch auch *Acetomonas*-Stämme mit polar monotricher Begeißelung und vervollständigte LEIFSONS Beschreibung der Gattung in diesem Sinne (SHIMWELL u. CARR, 1959). Die korrekte Bezeichnung für die Gattung der polar begeißelten, Essigsäure nicht oxydierenden Essigsäurebakterien lautet demnach: *Acetomonas* Leifson emend. Shimwell. Die Gattung der peritrich begeißelten, überoxydierenden Essigsäurebakterien trägt den Namen *Acetobacter* Beijerinck emend. Leifson.

Die Festlegung der Typus-Arten der beiden Gattungen von Essigsäurebakterien bietet insofern Schwierigkeiten, als von den Stämmen, die gemäß den Nomenklaturvorschriften als Typen zu verwenden sind, keine Originalkulturen mehr vorhanden sind. In dieser Situation scheint das Vorgehen von SHIMWELL u. CARR (1959, 1961) gerechtfertigt, als Typus-Art für die Gattung *Acetomonas* die früheste Beschreibung eines zur Oxydation von Essigsäure unfähigen Essigsäurebakteriums (SHIMWELL u. CARR, 1959), als Typus-Art für die Gattung *Acetobacter* die erste Beschreibung eines überoxydierenden Stammes auszuwählen (SHIMWELL u. CARR, 1961). Zurückgreifend auf die Beschreibung des Essigsäure nicht oxydierenden *Bacterium oxydans* durch HENNEBERG (1897) wird für die Gattung *Acetomonas* die Typus-Art *Acetomonas oxydans* (Henneberg) Shimwell u. Carr festgelegt. Als Typus-Art für die Gattung *Acetobacter* wird die Beschreibung von *Mycoderma aceti* (PASTEUR, 1864) verwendet, was zur Bezeichnung *Acetobacter aceti* (Pasteur) Beijerinck führt.

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, daß für die Systematik und Nomenklatur der Essigsäurebakterien auf der Stufe der Gattung eine befriedigende Lösung vorliegt, sollen im folgenden die Probleme diskutiert werden, die sich bei einer Arzteilung der Essigsäurebakterien ergeben. Es stellt sich vor allem die Frage, ob eine Arzteilung bei Essigsäurebakterien überhaupt möglich sei.

FRATEUR (1950) hat mannigfaltiges Stamm-Material aus verschiedenen Sammlungen einer kritischen Prüfung unterzogen, Synonyme aufgedeckt und ein auf biochemischen Merkmalen gründendes System für die Einteilung der Essigsäurebakterien aufgestellt. Er faßte die Essigsäurebakterien in der Gattung *Acetobacter* zusammen, die er in vier Gruppen und zehn verschiedene Arten einteilte. Die vier Frateurschen Gruppen sind durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

	<i>Peroxydans</i> - Gruppe	<i>Oxydans</i> - Gruppe	<i>Mesoxydans</i> - Gruppe	<i>Suboxydans</i> - Gruppe
Katalase-Reaktion ...	—	+	+	+
Oxydation von Azetat	+	+	+	—
Bildung von Ketosen aus Polyalkoholen	—	—	+	+
Bildung von Glucon- säure aus Glucose .	—	— oder +	+	+

Drei weitere Merkmale wurden von FRATEUR zur Unterscheidung der verschiedenen Arten verwendet: 1. Die Fähigkeit, auf Hoyers Medium [Äthanol als einzige Kohlenstoffquelle,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als einzige Stickstoffquelle] zu wachsen. 2. Die Bildung von Zellulose. 3. Die Bildung eines braunen Farbstoffes bei Wachstum auf Glucose.

SHIMWELL (1959) und SHIMWELL u. CARR (1961) sehen die Einteilung der Essigsäurebakterien nach FRATEUR in Frage gestellt. Sie stellten bei diesen Organismen eine außerordentlich hohe Mutationsrate und eine leichte Mutabilität wichtiger Merkmale fest. Es wird sogar vom Verlust der Eigenschaft, Äthanol zu Essigsäure zu oxydieren, berichtet (SHIMWELL u. CARR, 1960). Solche Beobachtungen scheinen bestätigt zu werden durch Berichte von SCHRAMM u. HESTRIN (1954) über den Verlust des Zellulosebildungsvermögens bei *Ab.*<sup>4)</sup> *xylinus* und von STOUTHAMER (1960) über den Verlust des Melaninbildungsvermögens bei *Am. melanogena*. GROMET u. HESTRIN (1963) berichten vom Gewinn der bisher als stabil betrachteten Eigenschaft „Wachstum auf Hoyers Medium“ durch *Ab. xylinus*. Eine Bestätigung dieser Beobachtung steht noch aus. Außer für das Merkmal „Oxydation von Essigsäure“ sind in der Literatur für alle gruppen- und artbestimmenden Eigenschaften des Frateurschen Systems Angaben über Variabilität zu finden. Wegen dieser ausgeprägten Variabilität der Stämme hinsichtlich der Einteilungsmerkmale kommt SHIMWELL zum Schluß, daß jede Arteinteilung von Essigsäurebakterien unmöglich sei.

DE LEY (1961) und SCHELL u. DE LEY (1962) beschäftigten sich ebenfalls mit dem Problem der Variabilität bei Essigsäurebakterien und gelangten zu einer anderen Ansicht. Sie stellten an eigenem Stamm-Material zum Teil die in der Literatur beschriebenen Mutationen fest, fanden aber, daß diese bei Essigsäurebakterien nicht häufiger auftreten als in anderen Bakteriengattungen. Die Experimente von SCHELL u. DE LEY (1962) unterscheiden sich von denjenigen SHIMWELLS vor allem durch eine ausführlichere biochemische Charakterisierung der untersuchten Stämme, was einen besseren Vergleich zwischen Wildtyp und Mutanten ermöglicht. So stellten SCHELL u. DE LEY (1962) wohl viele Mutanten in bezug auf die Kolonieform fest, konnten aber zeigen, daß sich diese in ihren biochemischen Merkmalen nicht vom Wildtyp unterscheiden.

Die Diskussion über die Variabilität der Einteilungsmerkmale und die Möglichkeiten einer Arteinteilung bei Essigsäurebakterien wurde bis jetzt unter Verwendung der von FRATEUR (1950) angegebenen gruppen- und artbestimmenden Merkmale geführt. Durch diese Merkmale wird den dissimilatorischen Vorgängen des Kohlenhydratstoffwechsels der Essigsäurebakterien starke Bedeutung verliehen. Die Fähigkeit zur Assimilation verschiedener Kohlenstoffquellen wird in geringerem Maße zur Unterscheidung der einzelnen Arten verwendet. Es fragt sich, ob bei Verwendung anderer, bisher nicht beigezogener Merkmale zur Charakterisierung der verschiedenen Arten die gleichen Schwierigkeiten bei der Arteinteilung festzustellen sind.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit hat daher zum Ziel, die Fragen der Variabilität und der Arteinteilung bei Essigsäurebakterien an einer Gruppe von

#### <sup>4)</sup> A b k ü r z u n g e n :

<i>Ab.</i> = <i>Acetobacter</i>	6PG = 6-Phosphogluconat
<i>Am.</i> = <i>Acetomonas</i>	KDPG = 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat
ATP = Adenosintriphosphat	NADP = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Azetyl-CoA = Azetyl-Coenzym A	PGI = Phosphoglucose-isomerase
DNS = Desoxyribonucleinsäure	Tris = Trishydroxymethylaminomethan
F6P = Fructose-6-Phosphat	TS = Trockensubstanz
FDP = Fructose-1, 6-Phosphat	
G6P = Glucose-6-Phosphat	

Merkmale zu untersuchen, die bisher wenig beachtet wurde. Mit Hilfe der Ernährungsansprüche der Essigsäurebakterien als Ausdruck ihrer assimilatorischen Fähigkeiten werden Stämme aus allen vier Frateurschen Gruppen zu klassifizieren versucht. Die als Einteilungsmerkmale verwendeten Ernährungsansprüche verschiedener Stämme werden auf ihre Veränderlichkeit geprüft.

Im zweiten Teil wird dann nach stoffwechselfmäßigen Erklärungen für das verschiedenartige Verhalten der einzelnen Ernährungsgruppen gegenüber den beiden Kohlenstoffquellen Äthanol und Glucose gesucht.

## A. Wachstumsversuche

Es liegen heute viele Untersuchungen über die oxydativen Fähigkeiten der Essigsäurebakterien vor. Unsere Kenntnisse der Ernährungsansprüche dieser Organismen in bezug auf Kohlenhydrate sind aber noch lückenhaft. Man weiß, daß *Ab. peroxydans*, *Ab. lovaniensis* und *Ab. aceti* befähigt sind, auf Hoyers Medium, d. h. mit Äthanol als einziger Kohlenstoff- und Ammoniumsulfat als einziger Stickstoffquelle zu wachsen (FRATEUR, 1950). Vertreter der Gattung *Acetomonas* sind unfähig, Äthanol, Essigsäure, Brenztraubensäure und Milchsäure als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwenden (RAO, 1955). *Ab. ascendens* und *Ab. peroxydans* können aus Glucose kein Zellmaterial aufbauen (DE LEY, 1961). Ferner haben RAINBOW u. MITSON (1953) und BROWN u. RAINBOW (1956) versucht, die Essigsäurebakterien auf Grund ihrer Nährstoff-, insbesondere ihrer Kohlenstoffansprüche, in zwei Gruppen einzuteilen: „Lactaphilen“ Essigsäurebakterien wachsen gut auf Milchsäure, aber schlecht auf Glucose. Sie sind in der Regel von Wuchsstoffen unabhängig und bauen Glutaminsäure, Asparaginsäure und Prolin zu andern „Ninhydrin-positiven“ Substanzen ab. „Glycophile“ Essigsäurebakterien wachsen gut auf Glucose, nicht aber auf Laktat. Sie verwerten Ammonstickstoff kaum, bauen Aminosäuren nicht ab und sind in den meisten Fällen in ihrem Wachstum von Wuchsstoffen abhängig.

Die Untersuchungen von RAINBOW und Mitarbeitern enthalten einige Widersprüchlichkeiten. In einer ersten Arbeit (BROWN u. RAINBOW, 1956) werden drei Stämme von *Am. oxydans* zu den „lactaphilen“ Essigsäurebakterien eingereiht, während gleichzeitig auf die Parallelität zwischen der Einteilung in „lactaphil“ und „glycophil“ und derjenigen in *Acetobacter* und *Acetomonas* hingewiesen wird. COOKSEY u. RAINBOW (1962) teilen später mit, daß die merkwürdig klassierten Stämme von *Am. oxydans* in Wirklichkeit Vertreter der Gattung *Acetobacter* gewesen seien. Die Gruppe der untersuchten „glycophilen“ Essigsäurebakterien umfaßt nach dieser Korrektur neben sechs nicht identifizierten Stämmen nur zwei Vertreter der Gattung *Acetomonas* [*Ab. capsulatus* Shimwell; *Ab. viscosus* (Baker, Day u. Hulton) Shimwell] und einen *Acetobacter*-Stamm (*Ab. turbidans* Cosbie, Tonic u. Walker). In der Gruppe der „lactaphilen“ sind zehn *Acetobacter*-Stämme und neun nicht identifizierte Stämme untersucht worden. Es kann daher nicht mehr von einer repräsentativen Auswahl von Stämmen gesprochen werden, und die Ansicht, daß die „lactaphilen“ Essigsäurebakterien der Gattung *Acetobacter* entsprechen, die „glycophilen“ der Gattung *Acetomonas*, wird durch die Versuche zu wenig belegt.

Die von RAINBOW und Mitarbeitern durchgeführten Wachstumsversuche sind auch in methodischer Hinsicht anfechtbar, da ungepufferte Nährlösungen ver-

wendet wurden, was, wie noch ausgeführt werden wird, keine zwischen verschiedenen Stämmen vergleichbare Resultate ergibt.

Die Feststellung der Kohlenstoffansprüche der Essigsäurebakterien wird durch die Tatsache erschwert, daß es bei der Durchführung von Wachstumsversuchen auf synthetischen Medien unmöglich ist festzustellen, ob das Fehlen einer geeigneten Kohlenstoffquelle oder der Mangel an einem Wuchsstoff oder einer geeigneten Stickstoffquelle wachstumsbegrenzend wirkt. Setzt man der synthetischen Nährlösung eine komplexe Wuchsstoff- und Stickstoffquelle, z. B. Hefeextrakt, zu, so fragt es sich, ob das Wachstum wirklich auf die Kohlenstoffquelle zurückzuführen ist oder ob nicht einfach Bestandteile des Hefeextrakts zur Synthese von Zellmaterial verwendet werden. Diese Fragen führen zu den Problemen der Wuchsstoff- und Stickstoffernährung, die in engem Zusammenhang mit der Kohlenstoffverwertung stehen.

Der Wuchsstoffbedarf von Essigsäurebakterien wurde erstmals durch UNDERKOFER, BANTZ u. PETERSON (1943) an *Am. oxydans* ATCC 621 untersucht. Sie stellten einen Bedarf an Nikotinsäure, p-Aminobenzoesäure und Pantothenensäure fest. *Am. melanogena* braucht außerdem nach GRAY u. TATUM (1944) noch Thiamin als Wachstumsfaktor. Verschiedene Spezies von Essigsäurebakterien wurden in der Folge auf synthetischen Nährlösungen gezüchtet, wobei in den meisten Fällen einer oder mehrere der angegebenen Wuchsstoffe für normales Wachstum genügten. Biotin soll nach einem einzigen, nicht weiter bestätigten Bericht von HALL et al. (1953) von gewissen Essigsäurebakterien benötigt werden.

Von RAO u. STOKES (1953 a), von GOLDMANN et al. (1958) und von JANKE u. RÖHR (1958) wurden Stämme von Essigsäurebakterien gefunden, die auf einer Nährlösung mit den bekannten Wachstumsfaktoren und einem Gemisch von 21 Aminosäuren und Caseinhydrolysat nicht zum Wachsen zu bringen waren. Diese Stämme, es handelte sich um Vertreter von *Ab. gluconicus* (*Ab. mesoxydans* oder *Am. oxydans*), *Ab. rancens*, *Am. oxydans* und *Am. melanogena*, benötigten unbekannt, in Hefeextrakt enthaltene Wachstumsfaktoren. Nach RAO u. STOKES (1953 b) kann die Wirkung des Hefeextrakts im Falle der *Acetomonas*-Stämme durch kleine Mengen von reduzierenden Zuckern ersetzt werden. Sie ist also nicht auf unbekannt Wuchsstoffe zurückzuführen, sondern darauf, daß mit dem Hefeextrakt eine zweite Kohlenstoffquelle in die Nährlösung gebracht wird. Für die Hefeextrakt-abhängigen Stämme von *Ab. gluconicus* und *Ab. rancens* bleibt die Frage nach der Natur dieses Faktors offen.

Der Aminosäurebedarf verschiedener Stämme von Essigsäurebakterien wurde durch STOKES u. LARSEN (1945) und durch FODA u. VAUGHN (1953) untersucht. Dabei erwiesen sich für normales Wachstum, je nach Stamm und Kohlenstoffquelle, eine oder mehrere der folgenden Aminosäuren als notwendig: Valin, Alanin, Isoleucin, Histidin, Cystin, Prolin, Asparaginsäure, Glutaminsäure.

## I. Material und Methoden

### 1. Organismen

Über die verwendeten Stämme gibt Tab. 1 Auskunft. Jeder Stamm wurde zuerst einer ausführlichen morphologischen und physiologischen Prüfung unterzogen. Die Begeißelung der Stämme wurde elektronenmikroskopisch beobachtet; die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften erfolgte nach FRATEUR (1950) in der von STOUTHAMER (1960) empfohlenen Aus-

Tabelle 1  
Untersuchte Stämme von Essigsäurebakterien

Gruppe nach FRATEUR (1950)	Herkunft und Name, unter dem die Stämme erhalten wurden	Instituts-Nummer und Benennung der Stämme
<i>Peroxydans</i> -Gruppe	<i>Ab. peroxydans</i> Visser 't Hooft NCIB 8616	109 <i>Ab. peroxydans</i> Visser 't Hooft
<i>Oxydans</i> -Gruppe	<i>Ab. ascendans</i> (Henneberg) Bergey et al. Nr. 5, Laboratorium für Mikrobiologie, Techn. Hochschule, Delft	194 <i>Ab. ascendans</i> (Henneberg) Bergey et al.
	<i>Ab. rancens</i> Beijerinck NCIB 8619	98 <i>Ab. rancens</i> Beijerinck
	<i>Ab. rancens</i> Beijerinck NCIB 8163	97 <i>Ab. rancens</i> Beijerinck
	<i>Ab. rancens</i> Beijerinck, Eidgenössische Landwirtschaftliche Versuchsanstalt, Wädenswil	31 <i>Ab. rancens</i> Beijerinck
	<i>Ab. rancens</i> Beijerinck, Eidgenössische Landwirtschaftliche Versuchsanstalt, Wädenswil	14 <i>Ab. rancens</i> Beijerinck
	<i>Ab. rancens</i> Beijerinck, Eidgenössische Landwirtschaftliche Versuchsanstalt, Wädenswil	32 <i>Ab. rancens</i> Beijerinck
	<i>Ab. rancens</i> Beijerinck, Eidgenössische Landwirtschaftliche Versuchsanstalt, Wädenswil	112 <i>Ab. rancens</i> Beijerinck
	<i>Ab. aceti</i> (Pasteur) Beijerinck NCIB 8554	114 <i>Ab. aceti</i> (Pasteur) Beijerinck
	<i>Ab. aceti</i> (Pasteur) Beijerinck, isoliert aus kontinuierlicher Essiggärung im Herbst 1961	3 <i>Ab. aceti</i> (Pasteur) Beijerinck
	<i>Gluconobacter liquefaciens</i> Asai, Prof. T. Asai, Institute for Applied Microbiology, Tokyo, Japan	101 <i>Ab. liquefaciens</i> Asai
<i>Mesoxydans</i> -Gruppe	<i>Ab. mesoxydans</i> Frateur NCIB 8622	96 <i>Ab. mesoxydans</i> Frateur
	<i>Ab. xylinum</i> (Brown) Holland NCIB 8747, celluloseless mutant	95 <i>Ab. xylinum</i> (Brown) Holland
	<i>Ab. xylinum</i> (Brown) Holland, Eidgenössische Landwirtschaftliche Versuchsanstalt, Wädenswil	27 <i>Ab. xylinum</i> (Brown) Holland
	<i>Ab. xylinum</i> (Brown) Holland ATCC 10 245	143 <i>Ab. xylinum</i> (Brown) Holland
	<i>Ab. xylinum</i> (Brown) Holland NCIB 1375	165 <i>Ab. xylinum</i> (Brown) Holland
	<i>Ab. xylinum</i> (Brown) Holland NCIB 7029	168 <i>Ab. xylinum</i> (Brown) Holland
	<i>Ab. suboxydans</i> Kluuyver und De Leeuw ATCC 621	114 <i>Am. oxydans</i> (Henneberg) Shimwell u. Carr
	<i>Ab. suboxydans</i> Kluuyver und De Leeuw, Welcome Research Laboratories CN 2605	100 <i>Am. oxydans</i> (Henneberg) Shimwell u. Carr
	<i>Ab. suboxydans</i> Kluuyver und De Leeuw, Welcome Research Laboratories CN 1221	99 <i>Am. oxydans</i> (Henneberg) Shimwell u. Carr
	<i>Ab. melanogenum</i> Beijerinck NCIB 8086	93 <i>Am. melanogena</i> (Beijerinck) comb. nov.
<i>Suboxydans</i> -Gruppe		

führung. Die in Tab. 1, Kolonne 3 angegebene Benennung der Stämme gründet auf den Resultaten dieser Voruntersuchung. Im Gegensatz zum Vorschlag von SHIMWELL u. CARR (1959), die alle Vertreter der Gattung *Acetomonas* in der einen Art *Am. oxydans* zusammenfassen, wird im folgenden zwischen den beiden Arten *Am. oxydans* und *Am. melanogena* unterschieden. Die Bildung eines braunen Farbstoffes bei Wachstum auf Glucose durch *Am. melanogena* hat sich nämlich als konstantes Merkmal erwiesen.

## 2. Aufbewahrung der Stämme

Das Bakterienmaterial wurde in Abständen von 10 Tagen auf frische Schrägagar-Röhrchen übergeimpft, während 3 Tagen bei 28 °C bebrütet und bis zur nächsten Impfung bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Stämme *Ab. peroxydans* 109, *Ab. ascendens* 194 und *Ab. xylinus* 27 wurden auf folgendem Medium (SCHELL, 1960) gehalten: Malzextrakt „Wander“ 1,5%; Hefeextrakt „Difco“ 0,5%; Äthanol 3%; Agar 2,5%. Alle übrigen Stämme wurden auf Glucose 10%; CaCO<sub>3</sub> 3%; Hefeextrakt „Difco“ 1%; Agar 2,5% (FRATEUR, 1950) geimpft. Außerdem wurden alle Stämme sofort nach Erhalt durch Gefriertrocknung konserviert.

## 3. Nährlösungen für Wachstumsversuche

Vorversuche hatten gezeigt, daß das Ausmaß des Wachstums von Essigsäurebakterien stark vom pH-Wert der Nährlösung abhängt. *Acetobacter*-Arten unterscheiden sich von *Acetomonas*-Arten in ihrer Abhängigkeit vom pH (MÜLLER, 1962). Das pH der Nährmedien verändert sich sehr stark im Verlaufe einer Kultur, weshalb, um vergleichbare Resultate zu erhalten, die Nährlösungen gepuffert werden mußten. In Tab. 2 ist die Wirkung der Pufferung auf das Wachstum gezeigt.

Tabelle 2  
Wirkung der Pufferung auf das Ausmaß des Wachstums

Stamm	gepuffert		ungepuffert	
	0,05 m Phthalatpuffer pH 5,5		% Trübung	End-pH
	% Trübung	End-pH		
31	64,2	5,5	17,6	3,8
95	58,8	5,3	63,7	3,9
3	15,4	5,0	1,8	3,6
93	16,8	5,0	16,1	3,1
101	39,8	5,0	13,1	3,0

Es wurde in allen Versuchen 0,05 m Phthalatpuffer pH 5,5 (RAUEN, 1956) verwendet, wodurch sowohl für *Acetobacter*- als auch für *Acetomonas*-Arten optimale Wachstumsbedingungen in bezug auf das pH gewährleistet waren. Bei Verwendung der Kohlenstoffquellen in einer Konzentration von 0,3% blieben die pH-Werte der Nährlösungen im Bereich zwischen pH 4,9 bis 5,5.

Eine von FODA u. VAUGHN (1953) angegebene synthetische Nährlösung diente als Grundlage für Wachstumsversuche. Mit den folgenden Nährstoffgruppen wurden gemäß Tab. 3 und 5 verschiedene Nährlösungen zusammengestellt:

Pro Liter 0,05 m Phthalatpuffer pH 5,5:

#### Kohlenstoffquelle

Äthanol .....	2,37 g
	(= 0,3% V/V)
oder	
Glucose .....	3,00 g
	(= 0,3% G/V)

#### Mineralien

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,50 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	0,38 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,20 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,01 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,01 g
NaCl .....	0,01 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	10,00 g

#### Aminosäuren 1

l-Valin .....	0,2 g
l-Isoleucin .....	0,2 g
l-Alanin .....	0,2 g
l-Prolin .....	0,2 g
l-Histidin .....	0,2 g
l-Cystin .....	0,2 g
l-Asparaginsäure .....	0,2 g

#### Aminosäuren 2

l-Arginin .....	0,2 g
l-Asparagin .....	0,2 g
l-Glutaminsäure .....	0,3 g
l-Glycin .....	0,1 g
dl-Leucin .....	0,25 g
l-Lysin .....	0,2 g
dl-Methionin .....	0,1 g
dl-Phenylalanin .....	0,1 g
dl-Serin .....	0,05 g
dl-Threonin .....	0,2 g
dl-Tryptophan .....	0,04 g
l-Tyrosin .....	0,1 g

#### Vitamine 1

Ca-Pantothenat .....	1,0 mg
p-Aminobenzoessäure .....	0,2 mg
Nikotinsäure .....	0,2 mg
Thiamin-HCl .....	1,0 mg

#### Vitamine 2

Pyridoxin-HCl .....	1,0 mg
Pyridoxamin-HCl .....	0,3 mg
Pyridoxal-HCl .....	0,3 mg
Lactoflavin .....	0,5 mg
Biotin .....	0,001 mg
Folsäure .....	0,01 mg
Meso-Inosit .....	25,0 mg

#### Purin- und Pyrimidinbasen

Cytosin .....	10,0 mg
Thymin .....	10,0 mg
Adeninsulfat .....	10,0 mg
Guanin-HCl .....	10,0 mg
Uracil .....	10,0 mg
Xanthin .....	10,0 mg

#### Spurenelemente

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	4,4 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ .....	0,004 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,2 mg
$\text{CaCl}_2$ .....	0,005 mg
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,25 mg

Die verschiedenen Nährstoffgruppen wurden getrennt sterilisiert. Mineralstoffe, Spurenelemente und Glucose wurden bei 120 °C und 1 Atü während 20 Min. autoklaviert. Aminosäuren, Vitamine und Purin- und Pyrimidinbasen wurden durch zweimaliges Erhitzen im strömenden Dampf während 20 Min. und in einem Abstand von mindestens 12 Std. entkeimt. Äthanol wurde in druckbeständigen Fläschchen autoklaviert. Darauf wurden die Lösungen steril in die Kulturgefäße abgefüllt und nochmals während 20 Min. gedämpft.

#### 4. Kulturbedingungen

Als Kulturgefäße für die Wachstumsversuche dienten 100 ml Erlenmeyerkölbchen, gefüllt mit 25 ml Nährlösung. Sie wurden auf einer Schüttelmaschine (100 Hin- und Herbewegungen pro Minute; Amplitude 6 cm) bei 28 °C während 112 Std. bebrütet.

#### 5. Impfmateriale

Das Impfmateriale für alle Versuche wurde auf folgender Nährlösung gezüchtet: Glucose 1%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2%; Hefeextrakt „Difco“ 1%;  $\text{H}_2\text{O}$  dest.; 1 Tropfen einer 48 Std. alten Kultur wurde zur Beimpfung jedes Erlenmeyerkölbchens verwendet.

Tabelle 3  
Einfluß der Stickstoff- und Wuchsstoffernährung auf die Kohlenstoffverwertung

	Phthalatpuffer pH 5,5 Mineralien		Phthalatpuffer pH 5,5 Mineralien Aminosäuren 1 Vitamine 1		Phthalatpuffer pH 5,5 Mineralien Aminosäuren 1 Vitamine 1 Hefeextrakt 0,5%		
	0,3% Äthanol	0,3% Glucose	0,3% Äthanol	0,3% Glucose	keine C-Quelle	0,3% Äthanol	0,3% Glucose
	mg TS/100 ml		mg TS/100 ml		mg TS/100 ml		
Gruppe 1 <i>Ab. peroxydans</i> 109 <i>Ab. aceti</i> 3 <i>Ab. aceti</i> 114 <i>Ab. liquefaciens</i> 101	+	—	43,1	4,0	18,2	67,5	6,5
	+	—	43,6	10,6	15,0	84,0	33,5
	+	—	28,9	13,5	10,2	92,2	26,5
	+	—	37,7	28,8	10,7	74,8	49,2
Gruppe 2 <i>Ab. rancens</i> 98 <i>Ab. ascendens</i> 194 <i>Ab. rancens</i> 97	—	—	27,6	12,1	14,0	110,0	33,5
	—	—	33,4	2,5	15,0	82,0	14,5
	—	—	46,9*	0,0	5,2	43,8	27,2
	—	—	34,6	65,4	20,1	85,8	147,8
Gruppe 3 <i>Ab. rancens</i> 14 <i>Ab. mesoxydans</i> 96 <i>Ab. rancens</i> 32 <i>Ab. xylinus</i> 27 <i>Ab. xylinus</i> 95 <i>Ab. xylinus</i> 113	—	+	33,4	65,1	17,7	75,5	158,0
	—	+	26,7	44,8	11,2	67,7	102,0
	—	+	16,2	35,4	7,7	52,2	58,8
	—	+	0,0	16,7	4,0	27,0	30,8
	—	+	0,0	74,3	5,7	53,5	90,0
	—	—	0,0	39,0	5,5	30,1	76,0
	—	+	0,0	43,9	4,0	6,5	77,0
Gruppe 3 <i>Am. oxydans</i> 111 <i>Am. oxydans</i> 100 <i>Am. oxydans</i> 99 <i>Am. melanogena</i> 93	—	—	0,0	19,3	2,0	6,5	28,0
	—	—	0,0	25,8	0,5	8,7	42,5
	—	—	0,0	29,4	1,5	8,2	33,7
	—	—	0,0	18,4	0,5	7,0	16,3

\*) Wachstum nur bei Zugabe der Aminosäuren 1 und 2.

## 6. Bestimmung des Wachstums

Das Wachstum wurde auf zwei verschiedene Arten bestimmt:

- Trübungsmessung im Photometer „Eppendorf“ bei 546 m $\mu$  und einer Schichtdicke von 1 cm. Als Vergleichswert diente unbebrütete oder, bei Farbstoff-bildenden Stämmen, bewachsene, durch Zentrifugation geklärte Nährlösung.
- Bestimmung der Trockensubstanz. Die bewachsene Nährlösung wurde bei 10 000  $\times$  g zentrifugiert und der Rückstand zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Darauf wurden die Zentrifugenröhrchen während 24 Std. bei 105 °C getrocknet und anschließend gewogen.

Die Wachstumsbestimmung durch Trübungsmessung gelangte in jenen Fällen zur Anwendung, wo verhältnismäßig geringes Wachstum auftrat. Versuche hatten gezeigt, daß nur Trübungswerte zwischen 15% und 80% in linearem Zusammenhang mit der Zellkonzentration stehen. Daher wurde das Wachstum in Fällen, wo ein Trübungswert von 80% überschritten worden wäre, durch Bestimmung der Trockensubstanz gemessen. Die Fehler, die bei der Trübungsmessung oder Trockensubstanzbestimmung von *Ab. xylinus* durch Zellulosepartikel entstehen, wurden nicht berücksichtigt.

## II. Ergebnisse

### 1. Kohlenstoffernährung

Die verschiedenen von Essigsäurebakterien verwerteten Kohlenstoffquellen können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Verbindungen wie Äthanol, Azetat, Milchsäure, Brenztraubensäure, deren Abbau über die Reaktionen des Zitronensäurezyklus verläuft, stehen einer Gruppe von Verbindungen wie Glucose, Fructose, Glycerin, Mannit gegenüber, die leicht in den Pentosephosphat-Zyklus eingeschleust werden. In Tab. 3 ist ein Versuch gezeigt, in dem je ein Vertreter dieser beiden Gruppen, Äthanol einerseits, Glucose andererseits, auf seine Eignung als Kohlenstoff- und Energiequelle für verschiedene Stämme von Essigsäurebakterien geprüft wurde. Die Wachstumsversuche wurden parallel auf drei verschiedenen Nährlösungen durchgeführt, die sich in der Art der Stickstoffquelle und dem Wuchsstoffgehalt unterschieden. Dadurch sollte die Abhängigkeit der Kohlenstoffverwertung von der Stickstoff- und Wuchsstoffernährung untersucht werden.

Die Resultate in Tab. 3 erlauben zuerst einmal eine Einteilung der Stämme nach der besser verwerteten Kohlenstoffquelle. Äthanol bevorzugende Stämme können von Glucose bevorzugenden unterschieden werden. Für diese Einteilung ist immer das Verhältnis der auf Äthanol gebildeten Trockensubstanz zu der auf Glucose gebildeten Trockensubstanz maßgebend. Die Berücksichtigung der absoluten Trockensubstanzwerte ergibt kein sinnvolles Bild.

Es muß noch erwähnt werden, daß sich Na-Azetat in allen Wachstumsversuchen als qualitativ gleichwertig mit Äthanol erwiesen hat. Wachstum auf Äthanol bedeutet also immer auch Wachstum auf Azetat.

Betrachtet man Äthanol und Essigsäure jedoch quantitativ, in bezug auf die molare Ausbeute an Zellschubstanz, so ist Äthanol das bessere Substrat. In Tab. 4 ist ein Wachstumsversuch wiedergegeben, in dem die Kohlenstoffquelle den wachstumsgrenzenden Faktor darstellt. Ein Vergleich der molaren Zellausbeuten ergibt, daß die Ausbeute pro Mol Äthanol rund doppelt so groß ist wie die Ausbeute pro Mol Essigsäure. Ein Teil der bei der Oxydation von Äthanol zu Essigsäure frei werdenden Energie kann also von den Essigsäurebakterien nutzbringend, d. h. zur Synthese von Zellschubstanz verwertet werden.

Tabelle 4

Molare Zellausbeuten von *Ab. aceti* 114 mit Äthanol und Essigsäure als Kohlenstoffquellen

Zusatz zur Grundnährlösung	mg TS/100 ml *)	mg TS/100 ml korrigiert für Wachstum auf Grundnährlösung allein
kein Zusatz .....	12,00	—
Essigsäure 0,01 m ...	23,2	11,2
Äthanol 0,01 m ...	34,8	22,8
Essigsäure 0,02 m ...	35,2	23,2
Äthanol 0,02 m ...	53,5	41,5

\*) Mittelwerte aus drei Parallelen. Endpunktsbestimmungen aus Zeitversuch in Schüttelkultur.

Die aus Tab. 3 ersichtliche Einteilung in Äthanol bevorzugende und Glucose bevorzugende Stämme scheint von der Stickstoff- und Wuchsstoffernährung un-

Tabelle 5. Einfluß der Stickstoff-, Wuchsstoff- und Spurenelementernährung

	Phthalatpuffer Äthanol			
	Mineralsalze	Mineralsalze Vitamine 1+2	Mineralsalze Vitamine 1+2 Spurenelemente	Mineralsalze Aminosäuren 1+2
	% Trübung	% Trübung	% Trübung	% Trübung
Gruppe 1 <i>Ab. aceti</i> 114 .....	38,0	43,9	41,8	63,5
Gruppe 2 <i>Ab. rancens</i> 98 ...	0,0	0,0	0,0	62,4
<i>Ab. ascendens</i> 194 .	0,0	0,0	0,0	54,4
<i>Ab. rancens</i> 97 ...	0,0	0,0	0,0	29,6
<i>Ab. rancens</i> 31: ...	0,0	0,0	0,0	42,5
<i>Ab. rancens</i> 14 ...	0,0	0,0	0,0	59,8
<i>Ab. mesoxydans</i> 96	0,0	0,0	0,0	21,7
<i>Ab. rancens</i> 32 ....	0,0	0,0	0,0	12,4
<i>Ab. xylinus</i> 27 ...	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Ab. xylinus</i> 95 ...	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Ab. xylinus</i> 113 ..	0,0	0,0	0,0	3,0
Gruppe 3 <i>Ab. rancens</i> 112 ..	0,0	0,0	0,0	0,0

abhängig zu sein. Glucose bevorzugende Stämme bilden auf der Aminosäuren-nährlösung mit oder ohne Hefeextraktzusatz mehr Trockensubstanz aus Glucose als aus Äthanol. Äthanol bevorzugende Stämme bilden, ebenfalls unabhängig vom Hefeextraktzusatz, mehr Trockensubstanz aus Äthanol als aus Glucose.

In der Einleitung wurde erwähnt, daß RAINBOW u. MITSON (1953) eine Gruppierung der Essigsäurebakterien vorschlagen, bei der Milchsäure und Glucose einander als Kohlenstoffquellen gegenübergestellt werden. Mit dieser Anordnung vermögen sie die Essigsäurebakterien in die beiden ohnehin voneinander getrennten Gattungen *Acetobacter* und *Acetomonas* zu unterteilen. Wird jedoch nach Tab. 3 Bevorzugung von Äthanol mit Bevorzugung von Glucose verglichen, so gelangt man zu einer Unterteilung innerhalb der Gattung *Acetobacter*. Es wird noch gezeigt werden, daß die Unterscheidung von Mesoxydants-Gruppe und Oxydants-Gruppe nach FRATEUR (1950) nicht befriedigend ist und daß das Bedürfnis besteht, weitere Möglichkeiten zur Differenzierung dieser beiden Gruppen zu finden. Die Gegenüberstellung von Glucose und Milchsäure als Kohlenstoffquellen trägt nichts zur besseren Abgrenzung dieser beiden Frateurschen Gruppen bei. Mit der Einteilung in Äthanol bevorzugende und Glucose bevorzugende Stämme wird hingegen ein Kriterium verwendet, das eine neue Möglichkeit für eine Einteilung der Stämme aus der Mesoxydants- und Oxydants-Gruppe aufzeigt.

auf die Äthanolverwertung durch Stämme aus Ernährungsgruppe 2

pH 5,5

0,3%

Mineralsalze Aminosäuren 1+2 Vitamine 1+2	Mineralsalze Aminosäuren 1+2 Vitamine 1+2 Spurenelemente	Mineralsalze Aminosäuren 1+2 Vitamine 1+2 Spurenelemente Purinbasen	Mineralsalze Aminosäuren 1+2 Vitamine 1+2 Spurenelemente Purinbasen Hefeextrakt 0,5%	Mineralsalze Casamino-acids Vitamine 1+2 Spurenelemente	Mineralsalze Casamino-acids Vitamine 1+2 Spurenelemente Hefeextrakt 0,5%
% Trübung	% Trübung	% Trübung	% Trübung	% Trübung	% Trübung
60,6	60,7	64,2	85,8	—	—
61,4	61,2	62,1	82,5	78,8	75,9
52,9	55,6	60,8	74,6	—	—
30,4	46,9	51,7	74,2	44,8	54,1
40,3	37,5	41,2	78,9	48,5	79,4
58,3	57,5	58,5	78,5	—	—
35,0	28,4	25,7	74,2	33,3	63,9
13,5	10,8	4,9	61,5	33,4	53,9
0,0	0,0	0,0	46,5	2,5	41,9
0,0	0,0	0,0	68,6	1,4	40,0
6,7	7,9	6,6	43,8	7,9	20,0
0,0	0,0	0,0	9,4	0,6	7,6

## 2. Stickstoff- und Wuchsstoffernährung

Ein weiterer Gesichtspunkt, der in Tab. 3 zur Einteilung der Stämme verwendet wurde, ist die Fähigkeit, Äthanol als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Mit „Wachstum auf Hoyers Medium“ werden diejenigen Stämme erfaßt, die unter den extremen Bedingungen einer sonst rein anorganischen Nährlösung zur Äthanolverwertung fähig sind. Über die Äthanolverwertung unter günstigeren Ernährungsbedingungen ist noch nichts bekannt. Berücksichtigt man auch diese, so lassen sich die untersuchten Essigsäurebakterien nach Tab. 3 in drei Ernährungsgruppen einteilen:

Gruppe 1 umfaßt Stämme, die auf Hoyers Medium wachsen. Sie sind Aminosäuren- und Wuchsstoff-autotroph.

In Gruppe 2 finden sich Aminosäuren- und Wuchsstoff-heterotrophe Stämme. Diese Gruppe ist heterogen in bezug auf die Stickstoff- und Wuchsstoffansprüche. Ein Teil der Stämme verwertet Äthanol bei Zusatz des Aminosäurengemischs 1 und der Vitamine 1. *Ab. rancens* 97 und die untersuchten *xylinus*-Stämme sind dagegen erst bei Zugabe des Aminosäurengemischs 2 bzw. bei Hefeextraktzusatz zur Äthanolverwertung befähigt.

Gruppe 3 schließt die Stämme der Gattung *Acetomonas* und *Ab. rancens* 112 ein. Diese Organismen bilden auch in Anwesenheit von Hefeextrakt auf Äthanol nur sehr wenig Trockensubstanz. Die Fähigkeit, Essigsäure zu oxydieren, geht meist mit dem Vermögen, Äthanol als Kohlenstoffquelle zu verwerten, parallel. In Ernährungsgruppe 3 finden sich deshalb die Stämme der Gattung *Acetomonas*. *Ab. rancens* 112 nimmt eine Sonderstellung ein, indem er befähigt ist, Essigsäure zu oxydieren, diese jedoch nicht als Kohlenstoffquelle benützen kann. Eine biochemische Erklärung für dieses Verhalten kann gegenwärtig noch nicht gegeben werden. Bei einem Ausbau der Einteilung nach Ernährungsansprüchen müßte diesem Stamm eine eigene Gruppe innerhalb der Gattung *Acetobacter* zugewiesen werden.

Tab. 5 zeigt einen Wachstumsversuch, in dem die Stickstoff- und Wuchsstoffabhängigkeit der Äthanolverwertung bei Stämmen aus Ernährungsgruppe 2 untersucht wurde. Bei Zugabe des Aminosäurengemischs 2 zur Grundnährlösung verwertet *Ab. rancens* 97 Äthanol als Kohlenstoffquelle. Die *xylinus*-Stämme konnten durch ein Gemisch von 19 Aminosäuren oder Caseinhydrolysat, 11 Vitaminen, Purin- und Pyrimidinbasen sowie Spurenelementen nicht zum Wachstum auf Äthanol gebracht werden. Diese Art scheint zur Äthanolverwertung einen oder mehrere in Hefeextrakt enthaltene Wachstumsfaktoren zu benötigen.

## 3. Einfluß von Hefeextrakt auf die Verwertung von Äthanol

Die *xylinus*-Stämme aus Ernährungsgruppe 2 und die Vertreter der Ernährungsgruppe 3 sind in der Äthanolverwertung von Hefeextrakt abhängig. Es stellt sich die Frage, ob die Ermöglichung der Äthanolverwertung durch Hefeextrakt in einer Wuchsstoffwirkung oder in der Lieferung einer weiteren Kohlenstoffquelle zu suchen sei.

Bei den untersuchten Stämmen von *Ab. xylinus* ermöglicht der Hefeextrakt eine echte Verwertung von Äthanol als Energie- und Kohlenstoffquelle. Die starke Wachstumsförderung durch geringe Hefeextraktgaben deutet auf eine Wuchsstoffwirkung des Hefeextrakts bei diesen Stämmen.

Bei den Stämmen der Ernährungsgruppe 3 berechtigen die geringe Förderung des Wachstums auf Äthanol durch Hefeextraktzusatz sowie Ergebnisse von Einbauversuchen mit radioaktivem Äthanol (s. Tab. 9) zur Annahme, daß Äthanol auch in Anwesenheit von Hefeextrakt nicht als Kohlenstoffquelle, sondern nur als Energiequelle verwertet werden kann. Nur die mit dem Hefeextrakt in die Nährlösung gebrachten Kohlenstoffquellen werden zum Aufbau von Zellsubstanz verwendet. Diese Unfähigkeit zur Assimilation von Äthanol wird durch die Tatsache erklärt, daß die Vertreter der Gattung *Acetomonas* keinen Zitronensäurezyklus besitzen (s. S. 346). Eine Verwertung von Äthanol auf bekanntem Wege über Azetat, Azetyl-CoA und Einschleusung in den Zitronensäurezyklus muß bei ihnen ausgeschlossen werden. Wie schon erwähnt, verhält sich *Ab. rancens* 112 als einziger Vertreter der Gattung *Acetobacter* in bezug auf die Äthanolverwertung gleich wie die *Acetomonas*-Stämme. Die in Tab. 3 bei Gruppe 3 beobachtete Erhöhung des Wachstums auf Äthanol durch Hefeextrakt wird dadurch erklärt, daß den Organismen in Form von Hefeextrakt eine verwertbare Kohlenstoffquelle geliefert wird. Die Förderung des Wachstums auf Hefeextrakt durch Äthanolzusatz (Fig. 1) muß auf Verwertung der Energie aus der Äthanoloxydation beruhen, nicht aber auf Einbau von Äthanol-Kohlenstoff.

Die hier gegebene Erklärung für die Wirkung des Hefeextrakts bei Stämmen aus Ernährungsgruppe 3 steht im Widerspruch zu einer Arbeit von RAO u. STOKES

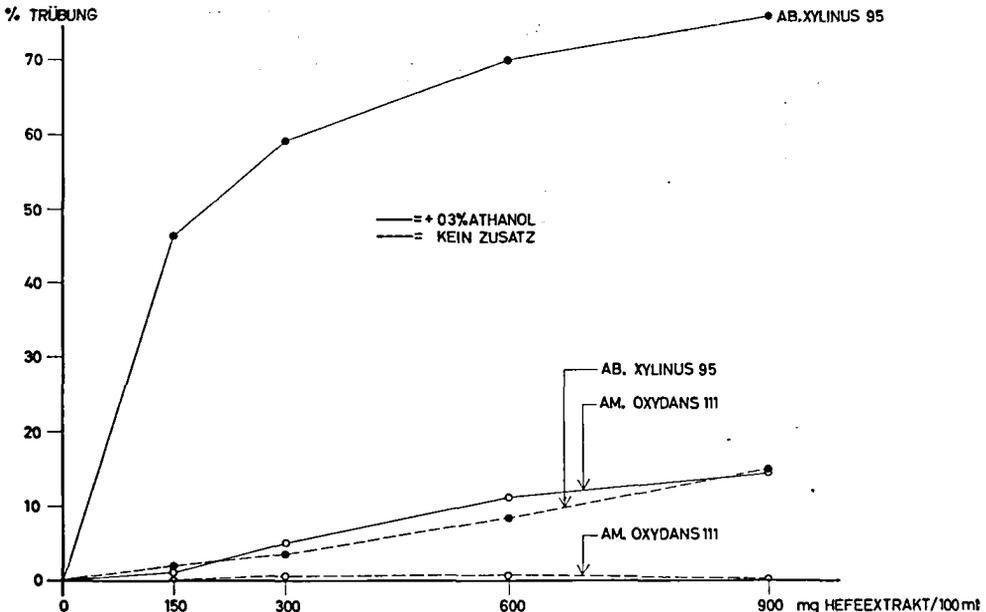


Abb. 1. Einfluß von Hefeextrakt auf die Verwertung von Äthanol

Tabelle 6  
Reproduzierbarkeit der Wachstumseigenschaften

Stamm	Phthalatpuffer Mineralien Aminosäuren 1 Vitamine 1 Äthanol 0,3%			Phthalatpuffer Mineralien Aminosäuren 1 Vitamine 1 Glucose 0,3%			Phthalatpuffer Mineralien Aminosäuren 1 Vitamine 1 Hefeextrakt 0,5% Äthanol 0,3%			Phthalatpuffer Mineralien Aminosäuren 1 Vitamine 1 Hefeextrakt 0,5% Glucose 0,3%		
	Aug. 62	Mai 63	Nov. 63	Aug. 62	Mai 63	Nov. 63	Aug. 62	Mai 63	Nov. 63	Aug. 62	Mai 63	Nov. 63
	% Trübung 546 m $\mu$											
	mg TS/100 ml											
<i>Ab. acetii</i> 3 .....	42,3	43,7	59,3	3,1	28,1	34,5	92,2	88,8	88,8	26,5	35,0	32,0
<i>Ab. acetii</i> 114 .....	53,2	28,6	58,1	13,7	19,5	21,0	84,0	65,3	51,0	33,5	32,5	30,0
<i>Ab. mesoxydans</i> 96 .....	34,9	29,0	45,4	76,1	73,5	77,0	67,0	62,5	69,0	102,0	85,0	82,0
<i>Ab. rancens</i> 112 .....	0,0	0,0	0,0	60,0	58,2	62,8	6,5	2,2	7,0	77,0	73,2	73,0
<i>Am. oxydans</i> 111 .....	0,0	0,0	0,0	22,7	33,0	28,7	6,5	6,5	6,5	28,0	26,2	27,0

(1953 b). Diese Autoren interpretieren die durch Hefeextraktzusatz hervorgerufene Wachstumssteigerung bei *Am. oxydans* auf Äthanol in dem Sinne, daß gewisse, im Hefeextrakt enthaltene Kohlenhydrate die Verwertung von Äthanol ankurbeln, d. h. seine Verwertung als Kohlenstoff- und Energiequelle ermöglichen würden.

#### 4. Variabilität der Eigenschaften

Im Hinblick auf die von SHIMWELL (1959) mitgeteilte Veränderlichkeit der Merkmale von Essigsäurebakterien wurden die in dieser Arbeit untersuchten Eigenschaften auf ihre Variabilität geprüft. Die Wachstumseigenschaften von fünf verschiedenen Stämmen wurden in Abständen von einigen Monaten bestimmt. Tab. 6 zeigt, daß diese Eigenschaften über einen längeren Zeitraum unverändert blieben.

Die nach der Frateurschen Systematik gruppenbestimmenden Eigenschaften von 19 Stämmen von Essigsäurebakterien wurden ebenfalls auf ihre Variabilität untersucht. Es wurde bei jedem Stamm ein Vergleich durchgeführt zwischen einer Kultur, die lyophilisiert aufbewahrt worden war und einer Kultur desselben Stammes, die während zwei Jahren in zehntägigen Abständen abgeimpft worden war. Nach 80 Passagen stimmte die abgeimpfte Kultur in bezug auf Katalasebildung, Oxydation von Azetat, Säurebildung aus Glucose und Ketogenität (Oxydation von Glycerin, Mannit, Sorbit und Erythrit) noch mit der lyophilisierten Kultur überein. Die Stämme entsprachen der Bezeichnung, unter der sie geführt wurden. Die von FRATEUR (1950) angegebene Oxydogramm-Technik zur Feststellung der Ketogenität wurde leicht modifiziert.

An Stelle von Agar-gezüchtetem Zellmaterial zur Beschickung der Oxydogramm-Platten wurde submers gezüchtetes und gewaschenes Zellmaterial verwendet. Die Inkubationszeit der Oxydogramme betrug durchwegs 24 Std.

Oxydogramme auf Sorbit und Mannit ergaben bei Stämmen aus der Oxydans-Gruppe nach FRATEUR (1950) unklare Resultate. In solchen Zweifelsfällen wurde die Oxydationsfähigkeit für Polyalkohole in manometrischen Versuchen geprüft.

Auch die nach der Frateurschen Systematik artbestimmenden Eigenschaften der Stämme, Wachstum auf Hoyers Medium, Zellulosebildung und Bildung eines braunen Pigments, wurden während längerer Zeit beobachtet. In keinem Fall wurde Verlust oder Gewinn der Fähigkeit, auf Hoyers Medium zu wachsen, festgestellt. Das Ausmaß der Zellulosebildung bei *Ab. xylinus* ist durch die Züchtungsbedingungen leicht beeinflussbar (SCHRAMM u. HESTRIN, 1954; DUDMANN, 1960). Der gleiche Stamm bildet in Schüttelkultur ungefähr zehnmal weniger Zellulose als in Standkultur. Es ist noch nicht bekannt, ob der Grund dafür in einer Begünstigung von zellulosefreien Mutanten durch die Schüttelkultur liegt, das Phänomen also genetisch zu erklären ist, oder ob, als physiologische Erklärung, unter dem Einfluß der besseren Belüftung eine Umsteuerung des Stoffwechsels stattfindet. Trotz der Beeinflussbarkeit des Zellulosebildungsvermögens trat bei den fünf untersuchten Stämmen von *Ab. xylinus* nie ein Verlust dieses Merkmals auf. *Ab. xylinus* 95, eine von SCHRAMM u. HESTRIN (1954) isolierte zellulosefreie Mutante, bildete hingegen nach wenigen Passagen Zellulose.

Auch das dritte artbestimmende Merkmal, die Farbstoffbildung durch *Am. melanogena* und *Ab. liquefaciens*, zeigte im Verlauf von zwei Jahren keine Veränderung.

## B. Stoffwechseluntersuchungen

Bis etwa zum Jahre 1952 erstreckten sich die an Essigsäurebakterien durchgeführten Stoffwechseluntersuchungen hauptsächlich auf die Erforschung der Oxydation der verschiedensten Substrate. Den Problemen des Intermediärstoffwechsels wurde verhältnismäßig wenig Beachtung geschenkt. So ist heute eine Menge von Informationen über die Oxydationsenzyme der Essigsäurebakterien vorhanden. Es liegen Berichte über das Vorkommen von zwei voneinander unabhängigen Enzymsystemen vor (u. a.: ARCUS u. EDSON, 1956; PRIEUR, 1957, 1960; DE LEY u. SCHELL, 1959 a, 1959 b; DE LEY u. DOCHY, 1960): Für viele Substrate kann neben einer Pyridinnukleotid-abhängigen Dehydrogenase noch eine Coenzym-unabhängige Dehydrogenase in der sogenannten Partikelfraktion der Zellextrakte lokalisiert werden.

Arbeiten über den Intermediärstoffwechsel der Essigsäurebakterien stammen hauptsächlich aus neuerer Zeit. Als wichtiger Schritt zum Verständnis des Kohlenhydratstoffwechsels dieser Organismen sind die Arbeiten von HAUGE, KING u. CHELDELIN (1955) zu nennen, in denen erstmals die Enzyme des Pentosephosphat-Zyklus bei *Am. oxydans* nachgewiesen wurden. KITOS et al. (1958) bewiesen dann in Tracerversuchen, daß durch *Am. oxydans* ATCC 621 mehr als die Hälfte der vorgelegten Glucose über den Pentosephosphat-Zyklus abgebaut wird. Durch RAO (1955), GROMET, SCHRAMM u. HESTRIN (1957), DE LEY (1958), KATZNELSON (1958), DE LEY u. SCHELL (1959 a) und STOUTHAMER (1960) wurden die Enzyme des Pentosephosphat-Zyklus bei verschiedenen Vertretern aus allen vier Frateur-schen Gruppen nachgewiesen.

Die schon lange bekannte Tatsache (HAUGE, KING u. CHELDELIN, 1955; FEWSTER, 1958; KITOS et al., 1958), daß sowohl ruhende Zellen als auch zellfreie Extrakte von *Acetomonas*-Stämmen unfähig sind, Zwischenprodukte des Zitronensäure-Zyklus zu oxydieren, wurde von STOUTHAMER (1959) an mehreren Stämmen von *Am. oxydans* nachgeprüft. Er kam zum Schluß, daß Stämme der Gattung *Acetomonas* nicht im Besitz des Zitronensäure-Zyklus sind, während alle *Acetobacter*-Arten einen funktionierenden Zitronensäure-Zyklus besitzen. Diese Feststellung erklärt die Unfähigkeit der *Acetomonas*-Stämme zur Oxydation von Azetat und unterstützt eine Zusammenfassung dieser Organismen in der Gattung *Acetomonas*.

Die ausführlichen Arbeiten von GROMET, SCHRAMM u. HESTRIN (1957) und von SCHRAMM, KLYBAS u. RACKER (1958) mit *Ab. xylinus* führten zur Entdeckung des Fructose-6-Phosphat-Zyklus, eines hypothetischen, anaeroben, zyklischen Abbauwegs. F6P wird durch die vorläufig nur bei *Ab. xylinus* bekannte F6P-Phosphoketolase in Erythrose-4-Phosphat und Azetylphosphat gespalten. Erythrose-4-Phosphat kann die Reaktionen des Pentosephosphat-Zyklus durchlaufen und würde schließlich, bilanzmäßig betrachtet, in zwei Moleküle Azetylphosphat aufgespaltet. Nach Auffassung von SCHRAMM, KLYBAS u. RACKER (1958) könnte es sich hier um einen „shunt“-Mechanismus handeln, durch den eine Umgehung der Reaktionen der Glykolyse, die bei *Ab. xylinus* nicht vollständig nachgewiesen werden konnten, möglich wäre.

Über die Bedeutung der Glykolyse im Kohlenhydratabbau durch Essigsäurebakterien herrschte lange Zeit Unklarheit. Auf Grund der Arbeiten von NEUBERG u. SIMON (1928 a, 1928 b) glaubte man die Essigsäurebakterien im Besitze der Enzyme der Glykolyse und zur alkoholischen Gärung befähigt. Die Resultate

von NEUBERG u. SIMON konnten jedoch nicht reproduziert werden, und Ergebnisse von später durchgeführten enzymatischen Untersuchungen zeigten, daß die Glykolyse bei Essigsäurebakterien nicht funktioniert (STOUTHAMER, 1960). Wohl sind verschiedene Enzyme dieses Systems nachgewiesen worden, aber in keinem Fall konnte Aktivität von F6P-Kinase, des einzigen für die Glykolyse spezifischen Enzyms, festgestellt werden.

Die Verbreitung und die Wichtigkeit des Glucose-Abbaus nach Etner-Doudoroff wurde bei Essigsäurebakterien noch wenig untersucht. KOVACHEVICH u. WOOD (1955) und KATZNELSON (1958) haben diesen Abbau-Weg bei Stämmen der Gattung *Acetomonas* nachgewiesen. In einer neuen Arbeit von WHITE u. WANG (1964) wird zum ersten Male vom Funktionieren des Entner-Doudoroff-Weges bei einer *Acetobacter*-Art, nämlich bei *Ab. xylinus*, berichtet.

Auch der Glyoxylsäurezyklus, ein Mechanismus, der den Aufbau von Zellsubstanz aus C-2-Verbindungen ermöglicht, war bis vor kurzem bei Essigsäurebakterien nicht untersucht worden. Erst STOUTHAMER et al. (1963) wiesen die beiden Schlüssel-Enzyme des Glyoxylsäurezyklus, Isocitratase und Malatsynthetase, an einem Stamm von *Ab. aceti* nach. Über die Verbreitung dieses Stoffwechselweges, der, gemäß der heutigen Kenntnisse, bei den zur Verwertung von Essigsäure befähigten *Acetobacter*-Arten von zentraler Bedeutung sein muß, ist noch nichts bekannt.

Mit den hier wiedergegebenen Stoffwechseluntersuchungen wurde versucht, Erklärungen für die Ergebnisse der Wachstumsversuche zu finden. Die Versuche waren darauf ausgerichtet, Korrelationen herzustellen zwischen dem Verhalten eines Stammes in Wachstumsversuchen und der Aktivität von gewissen Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels.

## I. Material und Methoden

### 1. Gewinnung von Zellmaterial

Das Zellmaterial für die enzymatischen und manometrischen Untersuchungen wurde auf folgender Nährlösung gezüchtet:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,38 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,2 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 g;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  0,01 g; NaCl 0,01 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10,0 g; Hefeextrakt „Difco“ 5,0 g; Phthalatpuffer 0,05 m pH 5,5 ad 1000 ml. Als Kohlenstoffquelle wurde 0,5% (G/V) Glucose oder 0,5% (V/V) Äthanol verwendet. Die Bebrütungstemperatur betrug 28 °C. Es kamen drei verschiedene Kulturverfahren zur Anwendung: Züchtung im rotierenden Rundkolben (2-Liter-Kolben mit 400 ml Nährlösung, 300 Umdrehungen pro Minute). — Züchtung in Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen (1-Liter-Kolben mit 200 ml Nährlösung, rotierende Schüttelmaschine mit 200 Umdrehungen pro Minute, Exzentrizität = 3 cm). — Züchtung in 7-Liter-Glasfermentern (New Brunswick Scientific Co.) mit 5 Liter Nährlösung (Rührwerkeinstellung = 300 Umdrehungen pro Minute, 0,5 Liter Luft pro Minute und Liter Nährlösung). Den Züchtungen in den New Brunswick-Fermentern wurde 0,2<sup>0</sup>/<sub>100</sub> Dow Corning Antifoam A-Emulsion zur Verhütung von Schaumbildung zugesetzt. Die Nährlösungen wurden mit 0,5 bis 1,0% einer 48 Std. alten Kultur beimpft und während 24–48 Std. bebrütet.

Die bewachsenen Nährlösungen wurden in der Servall RC-2-Zentrifuge bei +2 °C zentrifugiert. Zellmaterial für enzymatische Untersuchungen wurde darauf zweimal mit 0,01 m Phosphatpuffer pH 6,8 gewaschen, Zellen für manometrische Versuche mit Phosphatpuffer 0,01 m pH 6,0.

## 2. Herstellung zellfreier Extrakte

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die folgenden drei Methoden zur Herstellung zellfreier Extrakte miteinander verglichen:

**Die Hughes-Pressse** (HUGHES, 1951): 2–3 g Naßzellen werden mit dem dreifachen Gewicht Pyrex-Glaspulver und einigen Tropfen Puffer zu einem Brei vermengt und in die Hughes-Pressse eingefüllt. Der Hughes-Block mit dem Zellmaterial wird auf  $-35^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, worauf das gefrorene Zellen-Glaspulver-Gemisch mit Hilfe einer Spindelpresse durch einen 0,13 mm weiten Spalt gedrückt wird und auf der anderen Seite des Spaltes in immer noch gefrorenem Zustand in der gewünschten Menge Phosphatpuffer 0,01 m pH 6,8 aufgenommen werden kann. Durch Zentrifugation bei  $0^{\circ}\text{C}$  und  $10\,000 \times g$  während 30 Min. werden Glaspulver und Zelltrümmer vom Rohextrakt getrennt.

**Zerreiben mit Aluminium** nach McILWAIN (1948): 1–2 g Naßzellen werden mit dem doppelten Gewicht Aluminiumpulver (Alcoa A 303) gemischt, in einen Porzellanmörser gegeben und auf  $-35^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Die gefrorene Zellpaste wird dann im  $0^{\circ}\text{C}$ -Raum mit dem Pistill zerrieben, wobei sich zuerst grobe Brocken bilden, die mit der Zeit in ein feines, gefrorenes Pulver übergehen. Unter dem Einfluß der Reibungs- und der Handwärme taut dieses Pulver langsam auf. Es wird abwechslungsweise mit einigen Tropfen Puffer verdünnt und weiter zerrieben. Im ganzen wird das Zellen-Aluminium-Gemisch während 10 Min. im Mörser bearbeitet. Die Gewinnung des Rohextrakts erfolgt wieder durch Zentrifugation bei  $0^{\circ}\text{C}$  und  $10\,000 \times g$  während 30 Min.

**Ultraschallbehandlung**: Als dritte Aufschlußmethode wurde das Zellmaterial einer Ultraschallbehandlung im „Raytheon“-Ultraschallgerät (250 W; 10 KC) ausgesetzt. Es wurde die von STOUTHAMER (1960) angegebene Methode verwendet. Eine Suspension von 6 g Zellen in 50 ml Phosphatpuffer 0,01 m pH 6,8 wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  während 15 Min. mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die Suspension unter den gleichen Bedingungen wie bei den beiden anderen Methoden zentrifugiert.

Einheitliches Zellmaterial aus einer Züchtung von *Ab. acetii* 3 wurde nach den beschriebenen drei Methoden aufgeschlossen, und die erhaltenen Rohextrakte wurden auf ihre Aktivität an Isocitratase und Malatsynthetase untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 dargestellt und zeigen, daß die spezifischen Aktivitäten der Extrakte und das Verhältnis der beiden Enzymaktivitäten durch die verwendete Aufschlußmethode nicht wesentlich beeinflußt wird.

Tabelle 7  
Einfluß der Aufschlußmethode auf die spezifische Aktivität  
von Isocitratase und Malatsynthetase im Rohextrakt

Aufschlußmethode	mg Protein ml Extrakt	Verhältnis der spezifischen Aktivitäten	
		Isocitratase*)	Malatsynthetase*)
Nach McILWAIN .....	21,75	1,000	1,000
Hughes Presse .....	32,45	0,855	1,124
Ultraschall .....	23,65	0,766	0,846

\*) Die spezifische Aktivität beim Aufschluß nach McILWAIN wurde = 1,000 gesetzt.

Der Aufschluß der Zellen mittels Ultraschall im Raytheon-Gerät erfordert eine verhältnismäßig große Menge Zellmaterial. Aus diesem Grunde wurde auf eine Anwendung dieser Methode verzichtet, und zur Herstellung von zellfreien Extrakten die Hughes-Pressse oder in den meisten Fällen das Zerreiben im Mörser mit Aluminiumpulver benützt. Die frisch gewonnenen Zellextrakte wurden bei  $0^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und am selben Tage auf ihre Enzymaktivität untersucht.

### 3. Bestimmung von Enzymaktivitäten

#### a) Bestimmung der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus

**Isocitratase:** Die Isocitratase-Aktivität wurde nach DIXON u. KORNBERG (1959) bestimmt. Das Inkubationsgemisch enthielt in einem Totalvolumen von 3 ml: Phosphatpuffer pH 7,0, 200  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{MgCl}_2$  15  $\mu\text{mol}$ ; Phenylhydrazin-HCl 10  $\mu\text{mol}$ ; Cystein-HCl 0,26  $\mu\text{mol}$ ; Trisnatriumisocitrat (Sigma) 10  $\mu\text{mol}$ ; zellfreier Extrakt (ca. 2 mg Protein). Isocitronensäure wird durch die Wirkung der Isocitratase in Glyoxylsäure und Bernsteinsäure aufgespaltet. Glyoxylsäure verbindet sich mit Phenylhydrazin zu Glyoxylsäure-phenylhydrazon. Die Konzentration des gebildeten Glyoxylsäure-phenylhydrazon wurde durch Messung der optischen Dichte bei 313  $m\mu$  im Photometer „Eppendorf“ bestimmt. Die Enzymaktivität wird in  $\mu\text{mol}$  gebildeter Glyoxylsäure pro mg Protein und Stunde ausgedrückt.

**Malatsynthetase:** Die Bestimmung der Malatsynthetase erfolgte nach der Methode von REEVES u. AJL (1960). 3 ml Inkubationsgemisch enthielten: Tris-Puffer pH 8,0 50  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{MgCl}_2$  10  $\mu\text{mol}$ ; Azetyl-CoA (Nutritional Biochemicals Co.) 0,1  $\mu\text{mol}$ ; zellfreier Extrakt (ca. 0,3 mg Protein); Kalium-Glyoxylat 3  $\mu\text{mol}$ . Die Messungen wurden mit dem Beckman DU-Spektrophotometer ausgeführt. Azetyl-CoA hat ein Absorptionsmaximum bei 232  $\mu\text{mol}$ . Durch Beobachtung der Abnahme der optischen Dichte des Inkubationsgemisches bei 232  $\mu\text{mol}$  kann man den Verbrauch an Azetyl-CoA und damit die Rate der Enzymreaktion bestimmen. Aktivitätsangaben erfolgen in  $\mu\text{mol}$  gebildetes Malat pro mg Protein und Stunde.

#### b) Enzyme der Glucoseverwertung

**Glucokinase und Gluconokinase:** Methoden zur Kinasebestimmung, die auf der titrimetrischen (McDONALD, 1955) oder manometrischen (COLOWICK u. KALCKAR, 1943) Bestimmung der entstehenden Säureäquivalente beruhen, hatten sich in Vorversuchen als unzuverlässig erwiesen. Die hohe ATPase-Aktivität der Rohextrakte wirkte sich ungünstig auf die Genauigkeit aus. Auch die Verwendung einer Methode, bei der die säurestabilen Phosphate bestimmt werden, ergab keine befriedigenden Resultate (CRANE u. SOLS, 1955). Es wurde daher eine Methode zur Kinasebestimmung angewendet, bei der das entstandene Glucose-6-Phosphat bzw. 6-Phosphogluconat enzymatisch bestimmt wird. Die Bestimmung wird in zwei Schritten durchgeführt:

**Phosphorylierung:** In einem Volumen von 1 ml sind folgende Reagenzien enthalten: Puffergemisch pH 7,0 (Histidin 20  $\mu\text{mol}$ ; Trishydroxymethylaminomethan 20  $\mu\text{mol}$ ; Äthylen-diamintetraessigsäure 2  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{MgCl}_2$  2  $\mu\text{mol}$ ); Glucose oder Natriumgluconat 2  $\mu\text{mol}$ ; ATP 15  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{MgCl}_2$  8  $\mu\text{mol}$ ; zellfreier Extrakt (ca. 0,5 mg Protein). Das Reaktionsgemisch wird während 15 Min. bei 30°C inkubiert. Anschließend wird die Phosphorylierungsreaktion durch Zugabe von 1 ml Perchlorsäure 6% gestoppt.

**Bestimmung von G6P und 6PG:** Für die Bestimmung dieser beiden Substanzen wurde die von BERGMAYER (1962) angegebene Methode verwendet. G6P wurde unter Verwendung von käuflicher G6P-Dehydrogenase (Firma Boehringer und Söhne, Mannheim) bestimmt. 6PG-Dehydrogenase zur Bestimmung der 6PG wurde aus Rattenleber gemäß der Vorschrift von GLOCK u. McLEAN (1955) isoliert. Beide Enzyme waren frei von NADPH<sub>2</sub>-Oxydase.

Die Bestimmungsmethoden für die Kinase-Aktivitäten wurden verschiedenen Prüfungen unterzogen. Die Linearität der Phosphorylierungsreaktion in dem für die Messung verwendeten Zeitabschnitt ist in Abb. 2 dargestellt. In Abb. 3 wird die Abhängigkeit der Reaktion vom pH gezeigt. Glucokinase und Gluconokinase zeigen eine ähnliche Abhängigkeit vom pH, was einen Vergleich der beiden Enzymaktivitäten ermöglicht, ohne die Aktivitätsbestimmungen beim pH-Optimum der Enzyme durchführen zu müssen. Obschon das pH-Optimum der Phosphorylierungsreaktionen im alkalischen Bereich zu liegen scheint, wurde die Aktivitätsbestimmung bei pH 7,0 beibehalten. Die zellfreien Extrakte wurden ferner auf Phosphatase- und Phosphogluco-Isomerase-Aktivität geprüft. Es konnte keine Phosphatase-Aktivität

festgestellt werden. Während der Inkubation des Phosphorylierungsgemisches wurde ungefähr 10% des gebildeten G6P durch in den Extrakten vorhandene PGI zu F6P umgesetzt und wäre von der nachfolgenden enzymatischen Bestimmung des G6P nicht erfaßt worden. Durch Zugabe von PGI (Firma Boehringer und Söhne, Mannheim) zu den enteiweißten, G6P und F6P enthaltenden Extrakten wurde alles F6P wieder zu G6P umgewandelt und der Bestimmung zugänglich gemacht. Die Isomerase-Reaktion ging vollständig in Richtung G6P, da G6P durch die gleichzeitig ablaufende Dehydrogenase-Reaktion ständig aus dem System entfernt wurde.

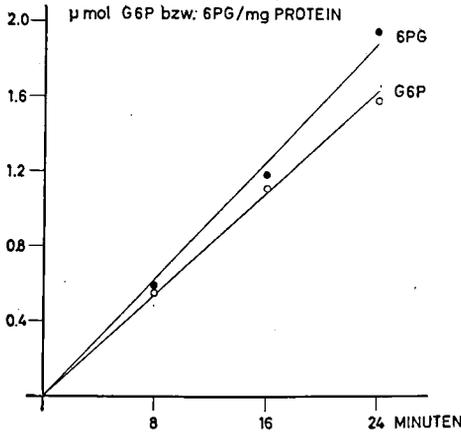


Abb. 2. Abhängigkeit der Phosphorylierungsreaktionen von der Zeit (*Ab. acetii* 3)

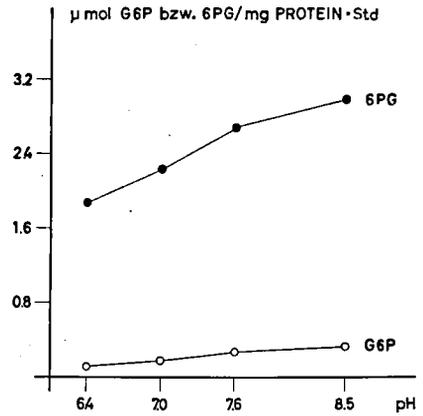


Abb. 3. Abhängigkeit der Phosphorylierungsreaktionen vom pH.  
(*Ab. rancens* 32; Trismaleat-Puffer 0,1 m)

Fructose-6-Phosphat-Kinase<sup>4)</sup>: Bei der Bestimmung der F6P-Kinase wurde F6P mit zellfreiem Extrakt und ATP inkubiert. Entstehendes Fructose-1,6-Phosphat würde durch die in den Extrakten vorhandene Fructose-1,6-Phosphat-Aldolase zu Triose-Phosphat abgebaut, das nach SIBLEY u. LEHNINGER (1949) bestimmt wurde.

<sup>4)</sup> Enzymbezeichnungen gemäß „Report of the Commission on Enzymes“ der I. U. B. (Symposium Series, Vol. 20, Pergamon Press, Oxford 1961):

ATPase = ATP Phosphohydrolase

FDP-Aldolase = D-Fructose-1,6-Phosphat Triosephosphat-Lyase

F6P-Kinase = ATP: D-Fructose-6-Phosphat 1-Phosphotransferase

F6P-Phosphoketolase = D-Fructose-6-Phosphat D-Erythrose-4-Phosphat-Lyase  
(Phosphat azetylierend)

Glucokinase = ATP: D-Glucose 6-Phosphotransferase

Gluconokinase = ATP: D-Gluconat 6-Phosphotransferase

Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase = D-Glucose-6-Phosphat: NADP Oxydoreduktase

Isocitratase = L<sub>s</sub>-Isocitrat Glyoxylat-Lyase

2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase = 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat  
D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Lyase

Malatsynthetase = L-Malat Glyoxylat-Lyase (CoA azetylierend)

Phosphogluconat Dehydratase = D-6-Phosphogluconat Hydro-Lyase

Phosphoglucose-Isomerase = D-Glucose-6-Phosphat Ketol-Isomerase

Fructose-1,6-Phosphat-Aldolase wurde nach der Methode von SIBLEY u. LEHNINGER (1949) bestimmt.

Enzyme des Glucoseabbaus nach Entner-Doudoroff: Die beiden; für den Glucoseabbau nach Entner-Doudoroff spezifischen Enzyme, 6PG-Dehydratase und 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconsäure-Aldolase, wurden in einer Folgereaktion nachgewiesen. 6PG wird in einem ersten Schritt durch 6PG-Dehydratase zu KDPG dehydriert. Die gebildete KDPG wird dann durch KDPG-Aldolase in Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Brenztraubensäure aufgespaltet, die im Inkubationsgemisch nachgewiesen werden kann.

Es gelangte die von KOVACHEVICH u. WOOD (1955) ausgearbeitete Methode zur Anwendung. In einem Volumen von 4 ml waren folgende Reagenzien enthalten (in der Reihenfolge des Zusatzes): Trispuffer pH 8,0 200  $\mu\text{mol}$ ; zellfreier Extrakt (ca. 2,5 mg Protein); Na-Glutathion 3  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{FeSO}_4$  6  $\mu\text{mol}$ ; 6PG 25  $\mu\text{mol}$ . Das Gemisch wurde während 20 Min. bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 ml Trichloressigsäure 10% gestoppt, die Lösung zentrifugiert und nach der direkten Methode von FRIEDEMANN u. HAUGE (1943) auf Brenztraubensäure untersucht.

#### 4. Manometrische Untersuchungen

Für die manometrischen Untersuchungen wurde eine Rund-Warburg-Apparatur der Firma Braun, Melsungen, Deutschland, benützt. Es wurde mit folgender Beschückung der Reaktionsgefäße gearbeitet:

Hauptgefäß: 2,3 ml Bakteriensuspension (ca. 30 mg Bakterien-Naßgewicht/ml Phosphatpuffer 0,1 m pH 6,0)  
Zentralgefäß: 0,2 ml KOH 20% oder  
0,2 ml Phosphatpuffer 0,1 m pH 6,0  
Seitenarm: 10  $\mu\text{mol}$  Substrat in 0,2 ml Phosphatpuffer 0,1 m pH 6,0  
Temperatur des Wasserbades: 30 °C; Schüttelamplitude: 3 cm; Schüttelfrequenz: 140  $\text{min}^{-1}$ .

#### 5. Chemische Bestimmungen

##### a) Zitronensäurebestimmung

Zitronensäure wurde mit der Pentabromozeton-Methode in der von STERN (1957) beschriebenen Ausführung bestimmt.

##### b) Stickstoffbestimmung

Die Stickstoffbestimmung erfolgte mit der Mikrokjeldahl-Methode.

##### c) Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde nach der Biuret-Methode bestimmt (COLOWICK u. KAPLAN, III, 450, 1957). Die dabei verwendete Eichkurve wurde mit „reinstem Serumalbumin vom Rind“ (Behring-Werke, Marburg-Lahn) ausgeführt. Angaben über den Proteingehalt beziehen sich somit auf dieses Rinderalbumin.

#### 6. Versuche mit Äthanol- $^{14}\text{C}$

Radioaktives Äthanol-1,2- $^{14}\text{C}$  wurde vom Radiochemical Centre in Amersham (England) bezogen. Die Nährlösungen hatten bei der Beimpfung eine spezifische Aktivität von ca. 50  $\mu\text{c}/100$  ml. Die Aktivitätsmessung erfolgte mit dem Geiger-Müller-Typ 18 536 der Firma Philips. Für die Radioaktivitätsbestimmung der Ausgangsnährlösung wurde 1 ml der Nährlösung in einem Probegeschälchen direkt ausgezählt. Zur Aktivitätsbestimmung der Bakterienzellen wurden 5–20 mg Zelltrockensubstanz in Schöniger-Kolben nach der von KALBERER u. RUTSCHMANN (1961) angegebenen Methode verbrannt. Das radioaktive Kohlendioxyd wurde in 3 ml Natronlauge 10% absorbiert, von der wiederum 1 ml ausgezählt wurde. Die Meßergebnisse wurden unter Berücksichtigung der während der Inkubation erfolgten Wasserverdunstung in % Äthanol-Kohlenstoff in der Bakterien-Trockensubstanz umgerechnet.

## II. Ergebnisse

## 1. Die Verwertung von Äthanol

Über die Fähigkeit zur Oxydation von Essigsäure entscheidet bei Essigsäurebakterien das Funktionieren des Zitronensäurezyklus. Der Gedanke liegt nahe, daß das Vermögen, Äthanol zu assimilieren, durch die Anwesenheit der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus bestimmt wird. Tab. 8 zeigt die Aktivitäten der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus in den verschiedenen Ernährungsgruppen. Isocitratase und Malatsynthetase konnten nur bei Vertretern der Ernährungsgruppe 1, den Stämmen, die zu Wachstum auf Hoyers Medium befähigt sind, nachgewiesen werden. Zellmaterial dieser Organismen, das auf derselben Nährlösung, jedoch mit Glucose statt Äthanol als Kohlenstoffquelle gezüchtet worden war, wies keine Aktivität der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus auf. Vertreter der Gruppe 2 zeigten wohl Wachstum auf einer Nährlösung mit Äthanol und Aminosäuren bzw. Aminosäuren und Hefeextrakt als Stickstoffquelle, scheinen aber nicht im Besitze der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus zu sein. Die Stämme aus Ernährungsgruppe 3 konnten nicht geprüft werden, da sie auf einer Nährlösung mit Äthanol als einziger Kohlenstoffquelle nur sehr wenig Zellmaterial bilden.

Tabelle 8

Die Enzyme des Glyoxylsäurezyklus in den verschiedenen Ernährungsgruppen  
Züchtung im rotierenden Rundkolben; Zellaufschluß in der Hughes-Press

	Stamm	Isocitratase	Malatsynthetase
		$\mu\text{mol Glyoxylat}$ mg Prot. · Std.	$\mu\text{mol Malat}$ mg Prot. · Std.
Gruppe 1	<i>Ab. peroxydans</i> 109 .....	0,687	2,559
	<i>Ab. aceti</i> 3 .....	1,878	7,998
	<i>Ab. aceti</i> 114 .....	1,560	15,360
	<i>Ab. liquefaciens</i> 101 .....	0,528*)	0,840
Gruppe 2	<i>Ab. rancens</i> 98 .....	0,132	0,015
	<i>Ab. ascendens</i> 194 .....	—	—
	<i>Ab. rancens</i> 97 .....	0,090	0,015
	<i>Ab. rancens</i> 31 .....	0,156	0,015
	<i>Ab. rancens</i> 14 .....	0,171	—
	<i>Ab. mesoxydans</i> 96 .....	0,090	—
	<i>Ab. rancens</i> 32 .....	—	—
	<i>Ab. xylinus</i> 27 .....	0,012	—
	<i>Ab. xylinus</i> 95 .....	0,105	—
	<i>Ab. xylinus</i> 113 .....	—	—
Gruppe 3	<i>Ab. rancens</i> 112 .....	—	—
	<i>Am. oxydans</i> 111 .....	—	—
	<i>Am. oxydans</i> 100 .....	—	—
	<i>Am. oxydans</i> 99 .....	—	—
	<i>Am. melanogena</i> 93 .....	—	—

\*) Bei Züchtung mit stärkerer Belüftung wurde bei diesem Stamm eine wesentliche Erhöhung der Isocitratase-Aktivität festgestellt (3,255  $\mu\text{mol Glyoxylat}/\text{mg Prot.} \cdot \text{Std.}$ ).

Der Verlauf der Isocitratase-Aktivität während des Wachstums ist in Abb. 4 dargestellt. Es sind wiederum nur Stämme aus Gruppe 1 (*Ab. aceti* 114, *Ab. liquefaciens* 101), bei denen Isocitratase-Aktivität festgestellt werden konnte. Kulturen von Vertretern der Gruppe 2 (*Ab. rancens* 98, *Ab. mesoxydans* 96) bilden dieses Enzym in keinem Zeitpunkt der Entwicklung aus, wodurch die Resultate von Tab. 8 bestätigt werden.

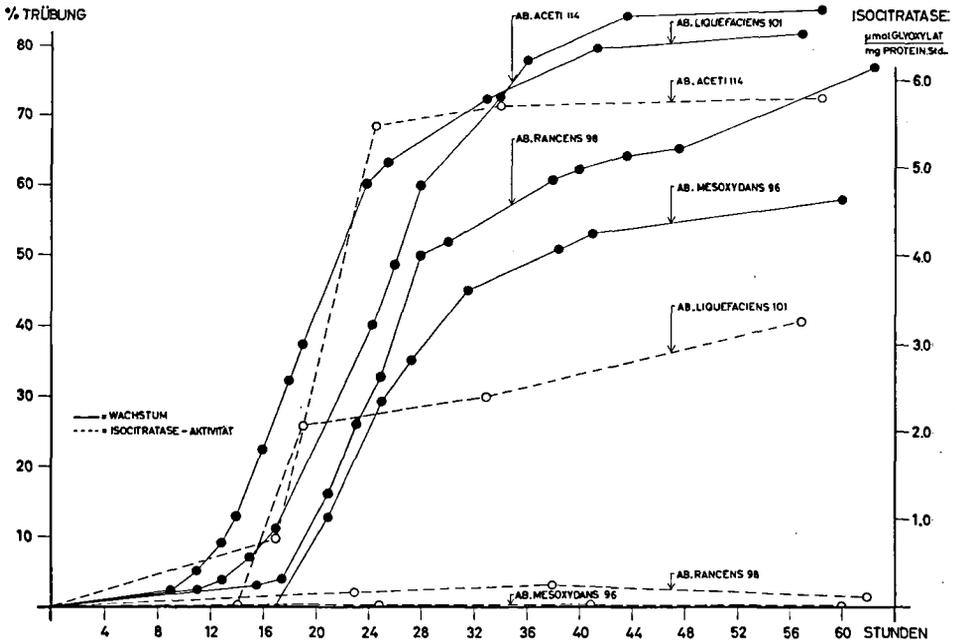


Abb. 4. Verlauf von Wachstum und Isocitratase-Aktivität

In einer nächsten Reihe von Versuchen ging es darum, abzuklären, ob sich die Anwesenheit der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus in der Menge des in die Zellen eingebauten Äthanol-Kohlenstoffs ausdrückt. Ist dies der Fall, so darf geschlossen werden, daß der Glyoxylsäurezyklus in der lebenden Zelle von Stämmen aus Gruppe 1 tatsächlich von Bedeutung ist. Es wurden Einbauversuche mit markiertem Äthanol-1, 2-<sup>14</sup>C durchgeführt. Die auf einer Nährlösung mit markiertem Äthanol gewachsenen Zellen von Stämmen aus verschiedenen Ernährungsgruppen wurden auf ihren Gehalt an radioaktivem Kohlenstoff untersucht. Die verwendeten Nährlösungen enthielten das Aminosäuregemisch 1 und 0,5% Hefeextrakt. Die Resultate sind in Tab. 9 wiedergegeben.

Der Gehalt an Äthanol-Kohlenstoff in der Trockensubstanz beträgt für *Acetobacter*-Stämme mindestens 13%. Der geprüfte *Acetomonas*-Stamm enthält nur 0,5% Äthanol-Kohlenstoff in der Trockensubstanz. Bei den *Acetobacter*-Stämmen zeichnen sich zwei Stämme aus Ernährungsgruppe 1, den Organismen mit Iso-

citratase- und Malatsynthetase-Aktivität, durch einen Äthanol-Kohlenstoff-Gehalt von 19—20% aus. Erwähnenswert ist die Tatsache, daß diese beiden Stämme (*Ab. aceti* 114, *Ab. aceti* 3) nicht nur deutlich mehr Äthanol in die Zellen einbauen als alle übrigen Stämme, sondern daß sie auch wesentlich höhere Aktivitäten an Isocitratase und Malatsynthetase aufweisen als die beiden anderen Stämme aus Gruppe 1 (vgl. Tab. 8). Die beiden anderen Stämme, *Ab. peroxydans* 109 und *Ab. liquefaciens* 101, besitzen wohl Isocitratase- und Malatsynthetase-Aktivität, unterscheiden sich aber bei Züchtung auf einem Aminosäuren enthaltenden Medium in bezug auf die Menge des eingebauten Äthanol in keiner Weise von *Acetobacter*-Stämmen, welche nicht im Besitze der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus sind.

Werden Organismen der Ernährungsgruppe 1 durch Züchtung auf modifizierten Hoyers Medium gewissermaßen zur Benützung des Glyoxylsäurezyklus gezwungen, so steigt die eingebaute Menge an Äthanol-Kohlenstoff in einem Fall auf 36%, im anderen auf 47%, was dem theoretisch erwarteten Ausmaß des Einbaus entspricht (vgl. Tab. 9).

Tabelle 9  
Gehalt an Äthanol-Kohlenstoff in der Trockensubstanz verschiedener Stämme  
von Essigsäurebakterien

Nährlösung	Ernährungs- gruppe	Stamm	% Äthanol-Kohlenstoff in der Trockensubstanz	
Äthanol 0,3% Phthalatpuffer Mineralien	1	<i>Ab. peroxydans</i> 109	10,76	<b>11,23</b>
			11,70	
Aminosäuren 1 Vitamine 1	1	<i>Ab. aceti</i> 3	18,81	<b>20,48</b>
			22,16	
Hefeextrakt 0,5%	1	<i>Ab. aceti</i> 114	18,25	<b>19,67</b>
			21,09	
	1	<i>Ab. liquefaciens</i> 101	13,83	<b>13,58</b>
			13,33	
Äthanol 0,3% Phthalatpuffer Mineralien	1	<i>Ab. aceti</i> 114	46,90	<b>46,90</b>
			36,49	
Äthanol 0,3% Phthalatpuffer Mineralien	2	<i>Ab. rancens</i> 98	13,56	<b>14,11</b>
			14,67	
Aminosäuren 1 Vitamine 1	2	<i>Ab. ascendens</i> 194	13,76	<b>13,86</b>
			13,96	
Hefeextrakt 0,5%	2	<i>Ab. mesoxydans</i> 96	12,07	<b>13,34</b>
			14,61	
	2	<i>Ab. xylinus</i> 95	13,72	<b>14,10</b>
			14,49	
	3	<i>Am. oxydans</i> 111	0,52	<b>0,59</b>
			0,66	

Die Äthanolassimilation durch Stämme von Essigsäurebakterien aus Ernährungsgruppe 1 scheint bei Züchtung auf Hoyers Medium über die Reaktionen des Glyoxylsäurezyklus zu verlaufen. Die Mechanismen, die bei diesen Stämmen und bei Stämmen aus Gruppe 2 unter weniger extremen Bedingungen zum Äthanol-einbau führen, sind noch nicht geklärt. Es wäre denkbar, daß die Essigsäurebakterien bei Wachstum auf Äthanol als einziger Kohlenstoffquelle die vorgelegten Aminosäuren und den zugesetzten Hefeextrakt zu Verbindungen abbauen, mit deren Hilfe der Zitronensäurezyklus in Betrieb gehalten werden kann. Die in der Nährlösung enthaltenen Aminosäuren und der Hefeextrakt würden in diesem Fall neben ihrer Funktion als Stickstoffquellen noch als Kohlenstoffquellen benützt und der Zitronensäurezyklus wäre in Funktion, obschon nur eine C-2-Verbindung als eigentliche Kohlenstoffquelle vorgelegt wurde.

Die im folgenden beschriebenen Hemmversuche mit Fluorazetat wurden in der Absicht durchgeführt, Anhaltspunkte für die Wahrscheinlichkeit dieser Hypothese zu gewinnen. Fluorazetat kann zum Nachweis des Zitronensäurezyklus in der lebenden Zelle verwendet werden. Angaben über die Wirkungsweise dieses Inhibitors sowie über Arbeiten, in denen dieser Stoff verwendet wurde, finden sich in einem Übersichtsreferat von PETERS (1957). PETERS (1952) spricht im Falle von Fluorazetat von einer „letalen Synthese“. Der Versuchsorganismus selbst synthetisiert nämlich aus dem nichttoxischen Fluorazetat den eigentlichen Inhibitor, Fluorizitat. Fluorazetat wird in gleicher Weise wie Azetat zu Fluorazetyl-CoA umgesetzt und kondensiert mit Oxalacetat zu Fluorizitat. Dieses blockiert nun durch kompetitive Hemmung die Aconitase. Durch den Ausfall der Aconitase sammelt sich Zitronensäure an.

Je nach der Bedeutung, die der Zitronensäurezyklus bei der Glucose- oder Äthanolverwertung durch verschiedene Essigsäurebakterien einnimmt, sollte unter Einwirkung von Fluorazetat verschieden starke Wachstumshemmung beobachtet werden können.

Für die in Abb. 5 gezeigten Hemmversuche mußten sehr hohe Konzentrationen von Fluorazetat verwendet werden, um Wachstumshemmungen zu erzielen. ALDOUS u. ROZEE (1956) zeigten in Versuchen mit Hefezellen, daß die toxische Wirkung von undissoziiertem Fluorazetat, nicht aber von dissoziiertem ausgeht. Bei pH-Werten über 4,5, was den pH-Werten der verwendeten Nährlösungen entspricht, ist der größte Teil des zugesetzten Fluorazetats dissoziiert. Um die Bakterienzellen einer wirksamen Konzentration an undissoziiertem Fluorazetat auszusetzen, müssen sehr hohe Fluorazetat-Zugaben gemacht werden. Die Ergebnisse der Hemmversuche (Abb. 5) zeigen, daß die untersuchten Stämme aus Ernährungsgruppe 1, sowie die Stämme der Gruppe 2 sowohl auf Äthanol als auch auf Glucose durch Fluorazetat deutlich im Wachstum gehemmt werden und Zitronensäure ansammeln. Daraus darf geschlossen werden, daß der Zitronensäurezyklus bei diesen Stämmen sowohl bei Verwendung von Glucose als auch bei der Äthanolverwertung von zentraler Bedeutung ist. Zwei Glucose bevorzugende Stämme aus Ernährungsgruppe 2, *Ab. rancens* 14 und *Ab. mesoxydans* 96, zeigen je nach Kohlenstoffquelle verschiedenes Verhalten gegenüber Fluorazetat. Bei Verwertung von Glucose sammeln diese beiden Stämme wohl Zitronensäure an, werden aber im Wachstum nicht gehemmt. Der Stoffwechsel scheint bei diesen Organismen bei Blockierung des Zitronensäurezyklus auf einen anderen Weg umgeschaltet zu

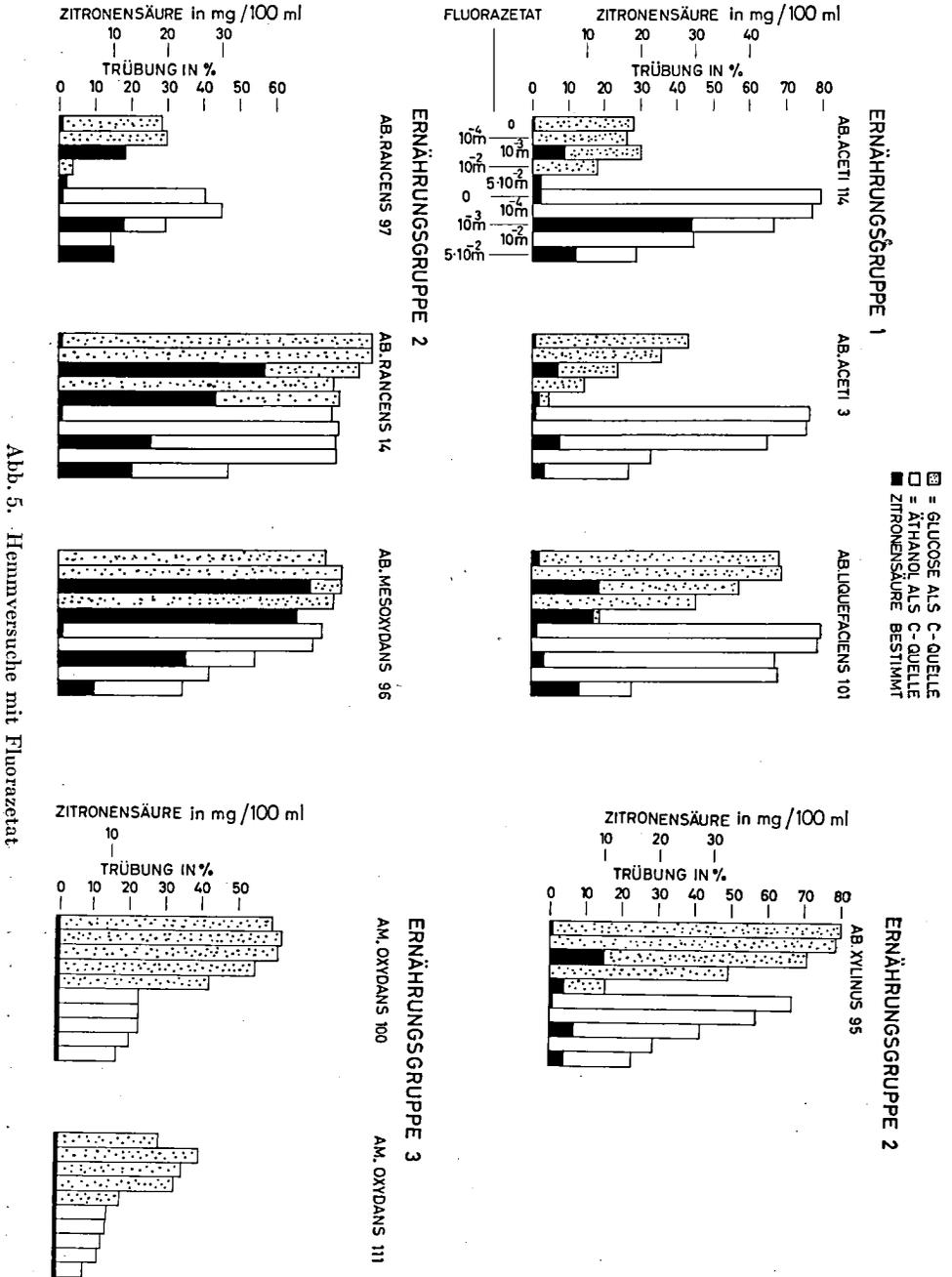


Abb. 5. Hemmversuche mit Fluorazetat

werden, was ihnen eine Weiterführung der für das Wachstum erforderlichen Synthesen erlaubt. Das Wachstum auf Äthanol wird auch bei diesen Organismen durch Fluorazetat gehemmt, wobei sich Zitronensäure ansammelt. Die beiden untersuchten Vertreter der Gattung *Acetomonas* wurden weder mit Äthanol noch mit Glucose als Kohlenstoffquelle durch Fluorazetat im Wachstum gehemmt. Wie auf Grund der heutigen Kenntnisse über den Stoffwechsel dieser Gruppe von Essigsäurebakterien zu erwarten war, sammelte sich auch keine Zitronensäure an. In der Durchführung von Versuchen über den Einfluß von Fluorazetat auf das Wachstum und die Bildung von Zitronensäure bietet sich also eine weitere Methode, die es erlaubt, die Zugehörigkeit eines Stammes von Essigsäurebakterien zur Gattung *Acetomonas* eindeutig festzustellen. *Ab. rancens* 112, der innerhalb der untersuchten *Acetobacter*-Stämme eine Sonderstellung einnimmt, indem er in die Ernährungsgruppe 3 eingeordnet werden muß, wurde auf sein Verhalten gegenüber Fluorazetat geprüft. Er zeigte deutliche Wachstumshemmung und Bildung von Zitronensäure, was trotz Unvermögen zur Äthanolverwertung auf komplexen Nährlösungen seine Zugehörigkeit zur Gattung *Acetobacter* rechtfertigt.

Die Hemmversuche mit Fluorazetat liefern eine Bestätigung der aufgestellten Hypothese. Sie zeigen, daß bei der Verwertung von Äthanol durch *Acetobacter*-Stämme auf komplexen Medien der Zitronensäurezyklus funktioniert. Eine Synthese von Zellsubstanz aus C-2-Bruchstücken, im vorliegenden Fall aus Äthanol, ist nach den heutigen Kenntnissen über die Reaktionen des Glyoxylsäurezyklus, nicht aber über den Zitronensäurezyklus möglich. Die *Acetobacter*-Stämme müssen also irgendwoher C-3- oder C-4-Bruchstücke zur Verfügung haben, die ein zyklisches Ablaufen des Zitronensäurezyklus ermöglichen. Solche C-3- oder C-4-Bruchstücke können unter den erwähnten Versuchsbedingungen nur aus den Aminosäuren oder dem Hefeextrakt der Nährlösung stammen.

## 2. Die Verwertung von Glucose

### a) Die verschiedenen Abbauewege der Glucose

Bei der in Anwendung gebrachten Einteilung der Stämme in Ernährungsgruppen wurde Äthanol als Kohlenstoffquelle verwendet. Führt man nun zusätzlich zu den Wachstumsversuchen mit Äthanol noch solche mit Glucose als Kohlenstoffquelle durch und vergleicht die Ausbeuten an Zellsubstanz auf den beiden Kohlenstoffquellen miteinander, so erhält man die Unterteilung des Spektrums der Stämme in Äthanol bevorzugende und Glucose bevorzugende Organismen (vgl. Tab. 3). Während die drei Ernährungsgruppen in Wachstumsversuchen scharf gegeneinander abgegrenzt werden können und sich auch, wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, in bezug auf ihren Stoffwechsel voneinander unterscheiden, sind die Übergänge zwischen Äthanol bevorzugenden und Glucose bevorzugenden Stämmen eher fließend. Dennoch drängt sich diese Einteilung auf, da z. B. zwischen *Ab. rancens* 98 mit einer Trockensubstanzmenge auf Glucose von 33 mg/100 ml und *Ab. rancens* 14 mit einer Ausbeute an Zelltrokensubstanz von 158 mg/100 ml unterschieden werden muß. Kenntnis der physiologischen Ursachen, die solch verschiedenartiges Verhalten der Stämme gegenüber Glucose bedingen, würden das Verständnis für den Stoffwechsel der Essigsäurebakterien vertiefen. Die folgenden Untersuchungen hatten daher zum Ziele, Erklärungen für die unterschiedliche Glucoseverwertung durch Essigsäurebakterien zu finden.

Als wichtigster Abbauweg für Glucose bei Essigsäurebakterien kann auf Grund der Angaben in der Literatur der Pentosephosphat-Zyklus angesehen werden. Er dürfte bei allen Stämmen vorhanden sein. Da über die Bedeutung von anderen Abbauwegen für Glucose, wie Glykolyse, Entner-Doudoroff-Weg, Fructose-6-Phosphat-Zyklus, verhältnismäßig wenig Angaben vorliegen, wurden die Aktivitäten einiger Schlüssel-Enzyme dieser Reaktionswege untersucht.

Vertreter der verschiedenen Ernährungsgruppen zeigten in bezug auf die Aktivitäten von zwei Enzymen der Glykolyse, F6P-Kinase und FDP-Aldolase, keine Unterschiede. Aktivität von F6P-Kinase, dem einzigen für die Glykolyse spezifischen Enzym, konnte, in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur, in keiner Gruppe festgestellt werden. Vertreter von verschiedenen Ernährungsgruppen besaßen ungefähr gleiche Aktivität von FDP-Aldolase, die im Mittel 1,3  $\mu\text{mol}$  Triosephosphat/Stunde und mg Protein betrug.

F6P-Phosphoketolase, das Schlüssel-Enzym des hypothetischen Fructose-6-Phosphat-Zyklus nach SCHRAMM, KLYBAS u. RACKER (1958) wurde in

Tabelle 10

Aktivität der Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges bei verschiedenen Stämmen von Essigsäurebakterien

Züchtung in Erlenmeyer-Kolben; Zellaufschluß nach McILWAIN (1948)

	Stamm	$\frac{\mu\text{mol Pyruvat}}{\text{mg Prot.} \cdot \text{Std.}}$
Gruppe 1	<i>Ab. peroxydans</i> 109 ....	—
	<i>Ab. aceti</i> 3 .....	0,000
	<i>Ab. aceti</i> 114 .....	0,086
	<i>Ab. liquefaciens</i> 101 ....	0,123
Gruppe 2	<i>Ab. rancens</i> 98 .....	0,173
	<i>Ab. ascendens</i> 194 .....	—
	<i>Ab. rancens</i> 97 .....	—
	<i>Ab. rancens</i> 31 .....	—
	<i>Ab. rancens</i> 14 .....	0,000
	<i>Ab. mesoxydans</i> 96 .....	0,018
	<i>Ab. rancens</i> 32 .....	0,000
	<i>Ab. xylinus</i> 27 .....	5,211
	<i>Ab. xylinus</i> 95 .....	5,145
<i>Ab. xylinus</i> 113 .....	5,400	
Gruppe 3	<i>Ab. rancens</i> 112 .....	0,118
	<i>Am. oxydans</i> 111 .....	0,892
	<i>Am. oxydans</i> 100 .....	1,040
	<i>Am. oxydans</i> 99 .....	0,577
	<i>Am. melanogena</i> 93 ....	2,093
zusätzlich geprüft:		
<i>Ab. xylinus</i> 165 .....	17,680	
<i>Ab. xylinus</i> 168 .....	5,018	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4,615	

zellfreien Extrakten von *Ab. xylinus* nachzuweisen versucht. Obschon der Nachweis an Extrakten von *Ab. xylinus* 95 (NCIB 8747), dem von SCHRAMM, KLYBAS u. RACKER verwendeten Stamm, durchgeführt wurde, fielen die Resultate negativ aus. Es konnte keine Aktivität der F6P-Phosphoketolase nachgewiesen werden.

Tab. 10 zeigt die festgestellte Aktivität der Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges. In der Gattung *Acetobacter* konnte nur bei den *xylinus*-Stämmen aus Ernährungsgruppe 2 Aktivität dieser Enzyme festgestellt werden. Zur Unterstützung dieser Resultate wurden noch zwei weitere Stämme von *Ab. xylinus* auf die Aktivität der Entner-Doudoroff-Enzyme untersucht (vgl. Tab. 10). Die zusätzlich geprüften Stämme waren auch im Besitze dieser Enzyme, was zur Annahme berechtigt, daß der Entner-Doudoroff-Weg unter den *Acetobacter*-Arten stets bei den Stämmen der Spezies *Ab. xylinus* und nur bei diesen vorkommt. Aus einem Vergleich mit der spezifischen Aktivität von *Pseudomonas fluorescens*, einem Organismus, bei dem ein großer Teil der Glucose über den Entner-Doudoroff-Weg abgebaut wird (KOVACHEVICH u. WOOD, 1955), geht hervor, daß die bei *Ab. xylinus* gefundene Entner-Doudoroff-Aktivität verhältnismäßig hoch ist.

Für Essigsäurebakterien aus der Gattung *Acetomonas* sind die Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges durch KOVACHEVICH u. WOOD (1955) bei *Am. oxydans* und durch KATZNELSON (1958) bei *Am. melanogena* nachgewiesen worden. Die Resultate von Tab. 10 stimmen mit diesen Angaben überein. Die untersuchten Stämme weisen, allerdings mit quantitativen Unterschieden, Entner-Doudoroff-Aktivität auf.

In Tab. 11 ist ein Versuch wiedergegeben, mit dem geprüft werden sollte, ob ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges und dem bei Essigsäurebakterien der Spezies *Ab. xylinus* beobachteten Zellulosebildungsvermögen besteht. Das Ausmaß der Zellulosebildung läßt sich

Tabelle 11

Wachstum, Zellulosebildung und Aktivität der Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges bei *Ab. xylinus* 113 in Standkultur und Schüttelkultur

Alter der Kultur Stunden	Standkultur (Fernbach-Kolben)			Schüttelkultur (Erlenmeyer-Kolben)		
	Wachstum*)	Zellulose	Enzym-aktivität	Wachstum*)	Zellulose	Enzym-aktivität
	$\frac{\text{mg N}}{1000 \text{ ml}}$	$\frac{\text{mg}}{200 \text{ ml}}$	$\frac{\mu\text{mol Pyruvat}}{\text{mg Prot.} \cdot \text{Std.}}$	$\frac{\text{mg N}}{1000 \text{ ml}}$	$\frac{\text{mg}}{200 \text{ ml}}$	$\frac{\mu\text{mol Pyruvat}}{\text{mg Prot.} \cdot \text{Std.}}$
36	—	—	—	10,9	—	2,258
47	—	—	—	49,5	—	—
69	—	11,5	6,080	85,4	6,8	6,540
117	23,8	69,2	3,200	88,2	11,8	0,982
213	96,6	100,1	—	98,0	5,3	0,299
285	96,6	109,6	1,266	—	—	—

\*) Als Maß für das Wachstum wurde die während der Inkubation aus der Nährlösung verschwundene Menge Stickstoff verwendet. Gravimetrische oder turbidimetrische Methoden zur Wachstumsbestimmung konnten wegen der Bildung von Zellulosehäuten nicht angewendet werden.

bei *Ab. xylinus* durch die Art und Weise der Züchtung beeinflussen. In Standkulturen wird mehr Zellulose gebildet als in Schüttelkulturen. Besteht ein Zusammenhang zwischen Zellulosebildung und Entner-Doudoroff-Weg, so müßte die Enzymaktivität in ähnlicher Weise wie die Zellulosebildung beeinflußt werden können. Tab. 11 zeigt, daß dies nicht der Fall ist und daß die Aktivität der Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges in Schüttelkultur und Standkultur die gleiche Höhe erreicht.

Bei Züchtung des Zellmaterials auf verschiedenen Kohlenstoffquellen wurden folgende spezifische Aktivitäten festgestellt: Glucose: 6,540, Äthanol: 3,300, Glycerin: 7,810, Mannit: 3,590. Da auf Äthanol keine Zellulose gebildet wird, sprechen diese Resultate ebenfalls gegen einen direkten Zusammenhang zwischen Entner-Doudoroff-Weg und Zellulosesynthese.

#### b) Die Primärreaktionen der Glucose

Die Prüfung der Aktivität verschiedener Enzyme des Glucose-Abbaus lieferte keine Erklärung für den Unterschied zwischen Glucose bevorzugenden und Äthanol bevorzugenden Stämmen. Da über die Primärreaktionen der Glucose noch gewisse Unklarheiten bestehen, wurde mit weiteren Untersuchungen an diesem Punkt eingesetzt.

DE LEY (1961) hat gezeigt, daß eine Korrelation zwischen der Verwertung von Glucose als Kohlenstoffquelle und der Oxydation von Glucose durch ruhende Zellen besteht. Wie aus Tab. 12 hervorgeht, konnte für die in dieser Arbeit untersuchten Stämme ebenfalls eine solche Tendenz festgestellt werden. Vollständige Oxydation von Glucose über den Pentosephosphat-Zyklus zu  $\text{CO}_2$  und Wasser entspricht einer Sauerstoffaufnahme von 6 Mol  $\text{O}_2$  pro Mol Glucose. Dieser Wert wird nie erreicht, da ein Teil der Glucose zu Gluconsäure oder Ketogluconsäure oxydiert wird und dadurch, nach DE LEY (1961), einer Oxydation über den Pentosephosphat-Zyklus entzogen wird. Man kann also von der Vorstellung ausgehen, daß zwei Abbauwege für Glucose, Pentosephosphat-Zyklus und direkte Oxydation zu Gluconsäure, miteinander in Konkurrenz stehen. Stämme, bei denen ein großer Anteil der vorgelegten Glucose über den Pentosephosphat-Zyklus verwertet wird, zeigen eine hohe Sauerstoffaufnahme pro Mol Glucose und bilden viel Zelltrocks substanz auf Glucose. Stämme, die Glucose vorwiegend zu Gluconsäure und Ketogluconsäure oxydieren, nehmen wenig Sauerstoff auf pro Mol Glucose und bilden auf dieser Kohlenstoffquelle wenig Zells substanz. Wie schon erwähnt, ist der Pentosephosphat-Zyklus bei Vertretern von allen vier Frateurschen Gruppen nachgewiesen worden. Es kann daher vermutet werden, daß geringe Sauerstoffaufnahme bei der Oxydation von Glucose nicht durch geringe Aktivität der Enzyme des Pentosephosphat-Zyklus verursacht wird, sondern eher in der mangelhaften Ausbildung eines Enzyms begründet liegt, das Glucose in den Pentosephosphat-Zyklus einschleust. Glucose bevorzugende Stämme wären demnach in der Lage, Glucose in den Pentosephosphat-Zyklus einzuführen; Äthanol bevorzugenden Stämmen scheint dies nicht oder nur in geringerem Maße möglich zu sein. Es stellt sich nun die Frage, welche Mechanismen über den Eintritt von Glucose in den Pentosephosphat-Zyklus entscheiden.

#### Phosphorylierungsreaktionen

Folgende Beobachtung ließ die Vermutung aufkommen, daß den Phosphorylierungsreaktionen eine wichtige Rolle in der Regulierung der Glucoseverwertung

zukommt: Der Unterschied in der Oxydationsstufe zwischen Glucose und Gluconsäure beträgt 0,5 Mol O<sub>2</sub>. In respirometrischen Versuchen mit ruhenden Zellen sollte daher bei der Oxydation von Glucose auch eine um 0,5 Mol O<sub>2</sub>/Mol Substrat höhere Sauerstoffaufnahme festgestellt werden können als bei der Oxydation von Gluconat. Für manche Stämme trifft dies zu, während wiederum bei anderen Stämmen (meist bei solchen mit geringerer Sauerstoffaufnahme bei der Oxydation von Glucose) der Unterschied in der Sauerstoffaufnahme zwischen Glucose und Gluconsäure wesentlich mehr als 0,5 Mol O<sub>2</sub>/Mol Substrat beträgt (vgl. Tab. 12). Glucose wird von solchen Stämmen mit 1,5—2,0 Mol O<sub>2</sub>/Mol Substrat oxydiert. Mit Gluconsäure kann dagegen keine Sauerstoffaufnahme festgestellt werden.

Tabelle 12  
Oxydation von Glucose und Gluconsäure durch die verschiedenen Gruppen  
von Essigsäurebakterien

		Stamm	$\frac{\text{Mol O}_2^*)}{\text{Mol Glucose}}$	$\frac{\text{Mol O}_2^*)}{\text{Mol Gluconsäure}}$
Äthanol bevorzugend	Gruppe 1	<i>Ab. peroxydans</i> 109 .....	0,00	0,00
		<i>Ab. aceti</i> 3 .....	1,40	0,04
		<i>Ab. aceti</i> 114 .....	1,53	0,01
		<i>Ab. liquefaciens</i> 101 .....	1,50	0,89
	Gruppe 2	<i>Ab. rancens</i> 98 .....	0,48	0,00
		<i>Ab. ascendens</i> 194 .....	0,07	0,02
		<i>Ab. rancens</i> 97 .....	0,33	0,00
Glucose bevorzugend		<i>Ab. rancens</i> 31 .....	4,32	3,78
		<i>Ab. rancens</i> 14 .....	4,53	3,66
		<i>Ab. mesoxydans</i> 96 .....	4,16	3,65
		<i>Ab. rancens</i> 32 .....	3,45	0,24
		<i>Ab. xylinus</i> 27 .....	1,00	0,88
		<i>Ab. xylinus</i> 95 .....	4,45	3,99
		<i>Ab. xylinus</i> 113 .....	3,63	3,80
	Gruppe 3	<i>Ab. rancens</i> 112 .....	2,46	2,08
		<i>Am. oxydans</i> 111 .....	2,18	0,10
		<i>Am. oxydans</i> 100 .....	1,97	0,63
		<i>Am. oxydans</i> 99 .....	1,98	0,45
		<i>Am. melanogena</i> 93 .....	1,57	1,13

\*) Die Werte sind korrigiert für die endogene Sauerstoffaufnahme.

Abb. 6 illustriert diese Beobachtung an zwei Stämmen aus der *Mesoxydans*-Gruppe nach FRATEUR (1950). *Ab. mesoxydans* 96 und *Ab. aceti* 3, ein Glucose bevorzugender und ein Äthanol bevorzugender Stamm, verhalten sich gegenüber Gluconsäure verschieden. Ruhende Zellen von *Ab. mesoxydans* 96 oxydieren Gluconsäure, solche von *Ab. aceti* 3 hingegen nicht. Abb. 7 zeigt einen respirometrischen Versuch mit zellfreien Extrakten der beiden Stämme. G6P und 6PG werden von Extrakten der beiden Stämme in gleicher Weise oxydiert, so daß der zwischen

den beiden Stämmen beobachtete Unterschied in der Oxydation von Glucose und Gluconat nicht in verschieden stark ausgebildeter Aktivität der Enzyme des Pentosephosphat-Zyklus begründet liegen kann. Der Mechanismus, der entscheidet, welcher Anteil der vorgelegten Glucose über den Pentosephosphat-Zyklus oxydiert wird, muß daher irgendwo in die Umwandlung von extrazellulärer Glucose zu

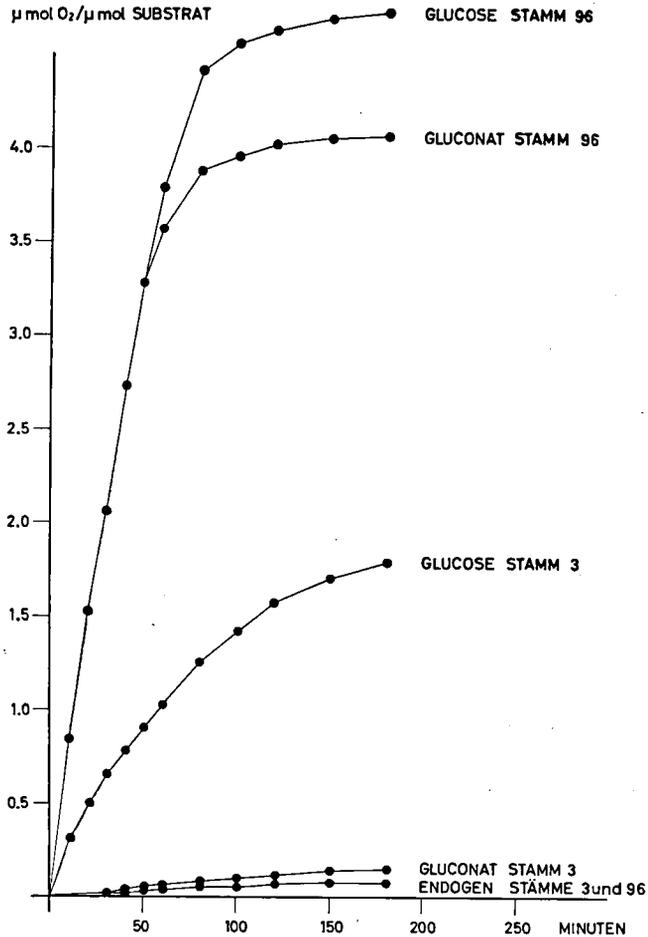


Abb. 6. Oxydation von Glucose und Gluconsäure durch ruhende Zellen von *Ab. mesoxydans* 96 und *Ab. aceti* 3

intrazellulärem G6P bzw. 6PG eingreifen. Eine Interpretation der in Abb. 6 und 7 dargestellten Versuche führt zu der Hypothese, daß die Ausnützung der Glucose als Kohlenstoffquelle durch Anwesenheit oder Abwesenheit von Gluconokinase

bestimmt wird. Glucose bevorzugende Stämme wie *Ab. mesoxydans* 96 wären im Besitze von Gluconokinase und könnten auch den zu Gluconsäure oxydierten Anteil der Glucose verwerten. Äthanol bevorzugende Stämme wie *Ab. aceti* 3 würden keine Gluconokinase besitzen, was ihnen die Verwertung von Gluconsäure unmöglich macht.

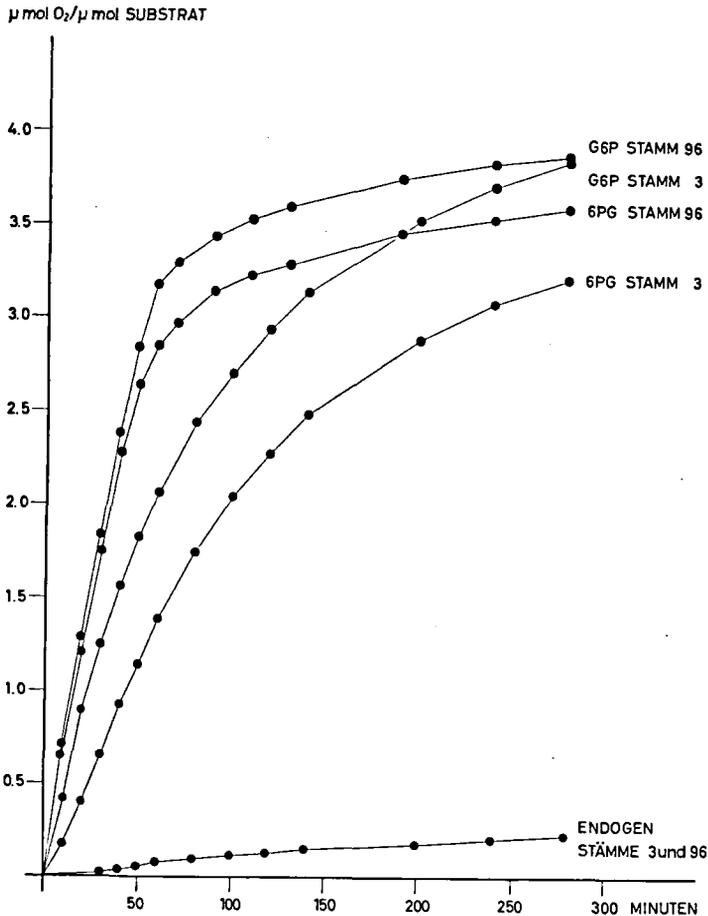


Abb. 7. Oxydation von G6P und 6PG durch zellfreie Extrakte von *Ab. mesoxydans* 96 und *Ab. aceti* 3. (Als Wasserstoff-Akzeptor wurden jedem Warburg-Kölbchen 0,7 mg N-Methyl-Phenazonium-Methosulfat zugesetzt)

Diese Hypothese wurde durch Bestimmung der Gluconokinase- und Gluconokinase-Aktivitäten in den zellfreien Extrakten der verschiedenen Stämme geprüft und konnte im Experiment nicht bestätigt werden. Wie aus Tab. 13 ersichtlich

ist, sind sowohl Äthanol bevorzugende als auch Glucose bevorzugende Stämme im Besitze von Gluconokinase, so daß diesem Enzym kein Einfluß auf die Glucoseverwertung zugeschrieben werden kann. Die Suche nach einem Mechanismus, der die Verwertung von Glucose bzw. Gluconsäure kontrolliert, muß fortgesetzt werden.

Tabelle 13  
Aktivität von Glucokinase und Gluconokinase in den verschiedenen Ernährungsgruppen  
Züchtung in Erlenmeyer-Kolben; Zellaufschluß nach McILWAIN (1948)

		Glucokinase	Gluconokinase	ungefähres Verhältnis	
		$\mu\text{mol G6P}$	$\mu\text{mol 6PG}$	Glucokinase	
		mg Prot. · Std.	mg Prot. · Std.	Gluconokinase	
Äthanol bevorzugend	Gruppe 1	<i>Ab. peroxydans</i> 109 ....	0,000	0,166	} 0,5
		<i>Ab. acetii</i> 3 .....	1,392	2,396	
		<i>Ab. acetii</i> 114 .....	1,096	1,936	
		<i>Ab. liquefaciens</i> 101 ....	2,200	3,464	
	Gruppe 2	<i>Ab. rancens</i> 98 .....	0,229	1,156	
		<i>Ab. ascendens</i> 194 .....	0,068	1,828	
<i>Ab. rancens</i> 97 .....		0,228	0,132		
Glucose bevorzugend		<i>Ab. rancens</i> 31 .....	0,460	4,392	} 0,1
		<i>Ab. rancens</i> 14 .....	0,483	2,595	
		<i>Ab. mesoxydans</i> 96 ....	0,039	1,894	} 1,0—2,0
		<i>Ab. rancens</i> 32 .....	0,262	2,679	
		<i>Ab. xylinus</i> 27 .....	1,094	1,060	
		Gruppe 3	<i>Ab. xylinus</i> 95 .....	1,102	0,528
	<i>Ab. xylinus</i> 113 .....		1,264	0,590	
	<i>Ab. rancens</i> 112 .....		0,501	4,440	
	<i>Am. oxydans</i> 111 .....		2,336	6,776	
	<i>Am. oxydans</i> 100 .....		2,248	4,573	
		<i>Am. oxydans</i> 99 .....	1,172	2,824	
	<i>Am. melanogena</i> 93 ....	2,945	0,363		

Bei den in Tab. 13 aufgeführten Kinase-Aktivitäten zeichnen sich gewisse Gruppen ab, in denen das Verhältnis Glucokinase-Aktivität zu Gluconokinase-Aktivität konstant bleibt. Diese Gruppen stimmen zum Teil mit den in Tab. 3 aufgestellten Ernährungsgruppen, zum Teil mit den Arten des Frateurschen Systems überein.

Eine Deutung der innerhalb der verschiedenen Gruppen festgestellten einheitlichen Kinase-Aktivitäten in Zusammenhang mit dem Glucosestoffwechsel der Gruppen kann mit den heutigen Kenntnissen nicht vorgenommen werden. Die Ergebnisse unterstützen jedoch die Feststellung, daß sich in der Vielfalt der Essigsäurebakterien auf Grund der Enzymmuster eine Gruppierung vornehmen läßt.

In Tab. 14 sind die Ergebnisse von Versuchen über den Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Kinase-Aktivität aufgeführt. Bei den untersuchten Kinasen scheint es sich um konstitutive Enzyme zu handeln, deren Aktivität sich durch die Züchtungsbedingungen nur wenig beeinflussen läßt.

Tabelle 14

Glucokinase und Gluconokinase bei Züchtung auf Äthanol und auf Glucose als Kohlenstoffquelle

Züchtung in Erlenmeyer-Kolben; Zellaufschluß nach McILWAIN (1948)

Stamm	Kinase	Äthanol gezüchtet	Glucose gezüchtet
		$\frac{\mu\text{mol G6P bzw. 6PG}}{\text{mg Protein} \cdot \text{Stunde}}$	
<i>Ab. aceti</i> 3 .....	Glucose	0,752*) 0,736	1,016*) 0,776
	Gluconat	0,284 0,664	1,304 1,144
<i>Ab. aceti</i> 114 .....	Glucose	0,600 0,604	1,140 1,168
	Gluconat	1,405 1,604	1,942 1,946
<i>Ab. ascendens</i> 194 .....	Glucose	0,100 0,052	0,084 0,052
	Gluconat	1,965 1,976	2,013 1,646
<i>Ab. mesoxydans</i> 96 .....	Glucose	0,052 0,068	0,064 0,016
	Gluconat	2,489 2,168	1,817 1,972
<i>Ab. rancens</i> 32 .....	Glucose	0,005 0,005	0,224 0,208
	Gluconat	1,044 1,236	3,136 2,697

\*) Jede Bestimmung wurde im Doppel, mit zwei unabhängig voneinander gezüchteten und aufgeschlossenen Ansätzen von Zellmaterial durchgeführt.

Unter den Resultaten in Tab. 13 ist die Tatsache hervorzuheben, daß *Ab. ascendens* 194, ein Stamm, der unfähig ist, Glucose als Kohlenstoffquelle zu verwerten, keine Glucokinase, wohl aber Gluconokinase-Aktivität besitzt. Die Funktion, die in diesem Organismus von der Gluconokinase erfüllt werden könnte, ist nicht bekannt. Ebenfalls interessant ist die Feststellung, daß bei einer Reihe

von Stämmen, die Gluconat nicht zu oxydieren imstande sind (*Ab. acetii* 3 und 114, *Ab. rancens* 32 und 98, *Ab. ascendens* 194, *Am. oxydans* 111), Gluconokinase ausgebildet ist. Auf Grund dieser Tatsache wurde die im nächsten Abschnitt untersuchte Hypothese aufgestellt.

### Permeabilität

Ein anderer Faktor, der die Verwertung von Gluconsäure und damit auch von Glucose beeinflussen könnte, wäre die Zellpermeabilität. Es ist denkbar, daß Glucose von den Zellen aufgenommen werden kann, Gluconsäure hingegen bei manchen Stämmen auf Permeabilitätsschranken stößt. Auf Grund der Ergebnisse von DE LEY u. DOCHY (1960), SCHELL (1960) und STOUTHAMER (1961) kann auch eine hypothetische Erklärung für die Tatsache gefunden werden, daß bei einigen Stämmen Glucose wohl intrazellulär zu Gluconsäure oxydiert wird, diese aber, trotz Vorhandensein der entsprechenden Enzyme nicht phosphoryliert und oxydiert werden kann. Die genannten Autoren konnten zeigen, daß in Zellen von Essigsäurebakterien zwei Gruppen von Enzymen räumlich voneinander getrennt sind: Die Coenzym-unabhängigen Dehydrogenasen lassen sich in der cytoplasmatischen Membran lokalisieren, während die Kinasen und die Enzyme des Pentosephosphat-Zyklus als lösliche Enzyme im Cytoplasma vorkommen. Glucose wird bei Essigsäurebakterien durch die Dehydrogenasen der cytoplasmatischen Membran zu Gluconsäure oxydiert. Bei den fraglichen Stämmen würde die cytoplasmatische Membran als Permeabilitätsschranke wirken, so daß die gebildete Gluconsäure nicht mit den Enzymen des Cytoplasma in Kontakt kommen kann und unverwertet bleibt.

Permeabilitätsversuche mit  $^{14}\text{C}$ -markierter Glucose und Gluconsäure nach der „Volume of Distribution“-Technik nach CONWAY u. DOWNEY (1950) zeigten jedoch, daß auch diese Erklärungsmöglichkeit für das beobachtete Phänomen ausgeschlossen werden muß. Glucose und Gluconat drangen bei *Ab. mesoxydans* 96 und bei *Ab. acetii* 3, bei zwei Vertretern der unterschiedlichen Verhaltensweisen gegenüber Gluconsäure, in gleichem Maße und mit gleicher Geschwindigkeit in die Zellen ein.

## C. Diskussion

### I. Systematik der Essigsäurebakterien

In der Einleitung wurde gezeigt, daß für die Frage der Gattungseinteilung der Essigsäurebakterien eine Lösung vorliegt. Der Vorschlag von LEIFSON (1954), polar begeißelte, Essigsäure nicht oxydierende Essigsäurebakterien in der Gattung *Acetomonas* zusammenzufassen und peritrich begeißelten, überoxydierenden Essigsäurebakterien die Gattung *Acetobacter* zuzuweisen, ist nach den heutigen Kenntnissen gerechtfertigt. Diesem Vorgehen wird jedoch von DE LEY (1961) und von DE LEY u. SCHELL (1963) entgegengehalten, daß die Gattungen *Acetomonas* und *Acetobacter* wahrscheinlich von gemeinsamen Vorfahren abstammen und deshalb ihre Unterbringung in verschiedenen Ordnungen der Klasse der *Schizomyzeten* unzulässig sei. DE LEY u. SCHELL (1963) haben versucht, die DNS-Zusammensetzung der Essigsäurebakterien zur Unterstützung ihrer Auffassung heranzuziehen. In der Tatsache, daß sie in der DNS von *Acetobacter*- und *Acetomonas*-

Stämmen einen ähnlichen prozentualen Gehalt an Guanin plus Cytosin feststellen konnten, sehen sie eine Bestätigung der Theorie über die gemeinsamen Vorfahren der beiden Gattungen von Essigsäurebakterien. Gleicher Guanin- plus Cytosin-Gehalt zweier Bakterienstämme ist aber noch kein Beweis für das Bestehen von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen diesen Stämmen. Wichtige Aufschlüsse über den Grad der Verwandtschaft zwischen den Gattungen *Acetobacter* und *Acetomonas* wären aus Transformations- und DNS-Hybridisierungsexperimenten zu erhoffen, wie sie z. B. von MARMUR et al. (1963) mit der Gattung *Bacillus* durchgeführt worden sind.

Die Frage, ob die Gattungen *Acetobacter* und *Acetomonas* als konvergierende Linien aus zwei verschiedenen Ordnungen aufzufassen sind oder ob man sie, in Übereinstimmung mit DE LEY (1961), als divergierende Äste ansehen will, die von gemeinsamen Vorfahren abstammen, sollte bei der Gattungseinteilung der Essigsäurebakterien berücksichtigt werden. Dies wird aber erst möglich sein, wenn mehr experimentelle Tatsachen über dieses Problem vorliegen, als das heute der Fall ist.

Die Arteinteilung der Essigsäurebakterien, wie sie von FRATEUR (1950) vorgeschlagen wurde, ist in letzter Zeit in Frage gestellt worden. Zwei Forschergruppen sind auf ganz verschiedenen Wegen und mit verschiedenen Argumenten zur Ansicht gelangt, daß bei diesen Organismen eine Arteinteilung unzweckmäßig sei. SHIMWELL (1959) begründet die Unmöglichkeit des Klassifizierens von Essigsäurebakterien mit der von ihm beobachteten außerordentlichen Variabilität der Einteilungsmerkmale. DE LEY (1961) sieht eine Arteinteilung deshalb für unzweckmäßig an, weil er in seinen Untersuchungen keine Gruppierung der Stämme um gewisse Schwerpunkte, sondern nur kontinuierliche Übergänge feststellen konnte. Will man am Artkonzept festhalten, so müßten seiner Meinung nach so viele Arten geschaffen werden, wie Stämme untersucht werden. Der Vorschlag dieser beiden Autoren, die Arteinteilung bei Essigsäurebakterien aufzugeben und nur zwischen zwei Gattungen oder Biotypen zu unterscheiden, steht heute der konventionellen Systematik [z. B. FRATEUR (1950), VAUGHN (1957)] gegenüber. Es gilt nun zu untersuchen, wie sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu diesen beiden grundsätzlich verschiedenen Ansichten verhalten.

Das von SHIMWELL (1959) gegen eine Arteinteilung vorgebrachte Argument der abnormal hohen Variabilität konnte in eigenen Versuchen nicht bestätigt werden. Sowohl die Einteilungsmerkmale der Frateurschen Systematik als auch die zusätzlich untersuchten Wachstumseigenschaften der geprüften Stämme blieben über einen längeren Zeitraum konstant und waren gut reproduzierbar (Tab. 6). Hätte es sich bei den untersuchten Stämmen um Gemische gehandelt oder wären im Laufe der Zeit durch Mutationen solche entstanden, so hätten sich die Wachstumseigenschaften der Stämme verändern müssen. Zum Beispiel wären durch ständiges Überimpfen auf Glucose-Agar Glucose bevorzugende Organismen selektioniert worden, hätten überhand genommen und die Resultate der Wachstumsversuche so verändert, daß aus einem ursprünglich Äthanol bevorzugenden Stamm ein Glucose bevorzugender entstanden wäre. Mutationen von Stämmen der *Mesoxydans*-Gruppe in die *Oxydans*-Gruppe, die nach SHIMWELL (1959) besonders häufig sind, hätten auf diese Weise entdeckt werden müssen.

Im Gegensatz zu der Ansicht von DE LEY (1961) zeigen die durchgeführten Versuche, daß sich innerhalb des Spektrums der Stämme einige deutlich von-

einander abgegrenzte Gruppen unterscheiden lassen. Während sich bei Verwendung der Frateurschen Merkmale eine Art nur durch eine Eigenschaft (im Extremfall durch den Besitz eines einzigen Enzyms) von der nächsten Art unterscheidet, können durch Beziehung zusätzlicher Merkmale Gruppen unterschieden werden, die durch mehrere Eigenschaften von der nächsten Gruppe abgegrenzt sind. So hebt sich die Art *Ab. xylinus* durch den Besitz des Entner-Doudoroff-Weges und den Bedarf an Hefeextrakt für die Äthanolverwertung sowie durch das Frateursche Merkmal der Zellulosebildung von den übrigen *Acetobacter*-Arten ab. *Ab. xylinus* ist also durch mehrere Enzyme von den anderen Essigsäurebakterien abgegrenzt. Damit ist für den Fall des *Ab. xylinus* das Argument DE LEYS (1961) gegen eine Arteinteilung entkräftet.

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche und der enzymatischen Versuche stehen im Widerspruch zu den Ansichten sowohl von SHIMWELL (1959) als auch von DE LEY (1961). Sie zeigen, daß eine Arteinteilung bei Essigsäurebakterien prinzipiell möglich ist. Der Erfolg und die Anwendbarkeit einer Arteinteilung werden von der Wahl und der Wertung der artbestimmenden Merkmale abhängen. Die vorliegenden Versuche führten zur Ansicht, daß beim heutigen Stand der Kenntnisse die Arteinteilung, wie sie von FRATEUR (1950) vorgenommen wurde, in Kombination mit der von LEIFSON (1954) vorgeschlagenen Gattungseinteilung, am zweckmäßigsten ist. Sie erlaubt es, ein unbekanntes Essigsäurebakterium mit verhältnismäßig geringem Arbeitsaufwand systematisch zu bestimmen. Trotzdem wird im folgenden die Frateursche Arteinteilung einer Kritik unterzogen. Dabei sollen Mängel besprochen und Möglichkeiten zu ihrer Verbesserung angedeutet werden.

Eine viel beanstandete Schwäche der Frateurschen Arteinteilung liegt darin, daß verschiedene Arten nur durch den Besitz eines einzigen Enzyms voneinander abgegrenzt sind. DE LEY (1961) wurde durch die Einsicht, daß die Frateurschen Merkmale für eine scharfe Arteinteilung nicht genügen, zur Aufgabe jeglicher Arteinteilung geführt. Eine andere Möglichkeit besteht jedoch darin, nach zusätzlichen Merkmalen für die Charakterisierung der verschiedenen Arten zu suchen. Am Beispiel von *Ab. xylinus* wurde gezeigt, daß durch Verwendung von neuen Merkmalen schärfere Artabgrenzungen geschaffen werden können.

Auch die Untersuchung bestehender Merkmale führt zu neuen Gesichtspunkten. In enzymatischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das Kriterium „Wachstum auf Hoyers Medium“ gleichbedeutend mit dem Besitz der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus ist. Es steht somit, obwohl in der Systematik nach FRATEUR (1950) nur artbestimmend, vom physiologischen Gesichtspunkt aus auf gleicher Stufe wie das gattungsbestimmende Merkmal der Oxydation von Essigsäure (Besitz des Zitronensäurezyklus). Von einer Wertung der Merkmale, die dieser Tatsache gerecht wird und die biochemische Verwandtschaft aller Stämme mit Glyoxylsäurezyklus zum Ausdruck bringt, wäre eine bessere Systematik zu erhoffen.

Die Unzulänglichkeit der Arteinteilung im Frateurschen System kommt in der Abgrenzung zwischen *Oxydans*-Gruppe und *Mesoxydans*-Gruppe am deutlichsten zum Ausdruck. Als Unterscheidungskriterium wird dabei das Merkmal der Ketogenität (Fähigkeit, Glycerin und Mannit zu Dioxyazeton bzw. Fructose zu oxydieren) gebraucht. Dieses Merkmal hat sich jedoch nicht bewährt. Es wurden Stämme gefunden, die intermediäre Eigenschaften zwischen *Oxydans*- und *Mesoxydans*-Gruppe aufweisen (STOUTHAMER, 1960: *Ab. mesoxydans*, *Ab. acetii* Ch 31,

*Ab. rancens* var. *turbidans*). Außerdem weist FRATEUR (1950) selbst darauf hin, daß ketogene und aketogene Stämme manchmal schwer voneinander zu trennen sind. Er empfiehlt das Problem der gegenseitigen Abgrenzung von *Mesoxydans*- und *Oxydans*-Gruppe weiterem Studium. Es stellt sich auch die Frage, inwiefern die willkürlich als Testsubstanzen gewählten Polyalkohole Glycerin und Mannit ein repräsentatives Bild der Ausrüstung eines Stammes mit Polyoldehydrogenasen ergeben.

In der Frage der Ketogenität scheint ein Fall vorzuliegen, in dem die Systematik erst dann weitere Fortschritte machen wird, wenn sie sich auf neue Erkenntnisse über die Physiologie der Organismen stützen kann. So wäre es sicher wichtig, Anhaltspunkte über den „Sinn“ der Polyoldehydrogenasen im Stoffwechsel der Essigsäurebakterien zu erhalten. Es ist noch nicht klar, ob die Zelle aus diesen Oxydationsreaktionen Nutzen zieht, oder ob die Reaktionen ablaufen, ohne ihr Energie oder Bausteine zu liefern.

Eine Einteilung der Essigsäurebakterien nach Ernährungsansprüchen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, stößt auf ähnliche Schwierigkeiten, wie sie für die Frateursche Systematik eben geschildert worden sind. Ernährungsgruppe 1 und Ernährungsgruppe 3, zwei extreme Gruppen aus dem Spektrum der Stämme, lassen sich gut definieren. Dazwischen liegt aber Ernährungsgruppe 2, eine sehr heterogene Mittelgruppe. Sie enthält Stämme aus der *Oxydans*- und *Mesoxydans*-Gruppe nach FRATEUR (1950). In ähnlicher Weise, wie FRATEUR die *Mesoxydans*- und *Oxydans*-Gruppe mit Hilfe der Ketogenität voneinander trennt, wurde Ernährungsgruppe 2 auf Grund der Glucoseverwertung in Glucose bevorzugende und Äthanol bevorzugende Stämme aufgeteilt. Eine enzymatische Erklärung für das verschiedenartige Verhalten der Stämme gegenüber Glucose konnte jedoch noch nicht gefunden werden.

Dem Versuch einer Einteilung nach Ernährungsansprüchen lag der Gedanke zugrunde, daß das ernährungsmäßige Verhalten der Organismen nicht von einem einzigen, an der Peripherie des Stoffwechsels gelegenen Enzym abhängt, sondern Ausdruck des Funktionierens ganzer Stoffwechselwege sein müßte. Es wäre denkbar, daß bei Verwendung solcher im Zentrum des Stoffwechsels gelegener Eigenschaften verschiedene Gruppen oder Arten besser gegeneinander abgegrenzt werden können als mit der Frateurschen Systematik. Es schien wünschenswert, einen Ersatz für das Merkmal der Ketogenität nach FRATEUR zu finden. Das Kriterium der Glucoseverwertung ließ sich aber nicht mit einem Enzym, einer Gruppe von Enzymen oder einem Stoffwechselweg in Zusammenhang bringen, so daß vorläufig kein Anlaß besteht, das Frateursche Kriterium der Ketogenität durch das Kriterium der Glucoseverwertung ersetzen zu wollen.

## II. Probleme des Stoffwechsels bei Essigsäurebakterien

Die vorliegenden enzymatischen Untersuchungen wurden in der Absicht durchgeführt, Erklärungen für die Bevorzugung von Äthanol oder Glucose als Kohlenstoffquelle zu finden. In der Frage der Äthanolverwertung konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit von Ernährungsgruppe 1, Äthanol bei Züchtung auf einem rein mineralischen Medium zu assimilieren, auf den Besitz der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus zurückzuführen ist. Dadurch kann das Kriterium „Wachstum auf Hoyers Medium“ enzymatisch erklärt werden. Einbauversuche mit Äthanol-<sup>14</sup>C

geben Auskunft über die Rolle, die der Glyoxylsäurezyklus in der lebenden Zelle von Essigsäurebakterien spielt. Die Resultate dieser Versuche (Tab. 9) zeigen, daß die Zellen dem Aufbau von Zellsubstanz über den Zitronensäurezyklus den Vorzug geben. Erst wenn sie dazu gezwungen werden, d. h. wenn eine C-2-Verbindung als einzige Kohlenstoffquelle vorliegt, wird der Glyoxylsäurezyklus benützt.

Diese Ergebnisse zeigen Ähnlichkeit mit Versuchen von STOUTHAMER (1960), der in Arbeiten mit *Ab. liquefaciens* bei Züchtung auf einem Mineralmedium mit Azetat als Kohlenstoffquelle und Hefeextraktzusatz keine Isocitratase- oder Malatsynthetase-Aktivität feststellen konnte. Wurde derselbe Organismus jedoch auf einer synthetischen Mineralnährlösung, wiederum mit Azetat als einziger Kohlenstoffquelle und ohne Hefeextraktzusatz, gezüchtet, so ließen sich die Enzyme des Glyoxylsäurezyklus nachweisen (STOUTHAMER et al., 1963).

In den hier beschriebenen Versuchen (Abb. 4) wurde auch bei Züchtung mit Hefeextraktzusatz Isocitratase festgestellt. Warum dieses Enzym ausgebildet wird, seine Anwesenheit sich aber nicht oder nur in geringem Maße (*Ab. aceti*) auf die Menge des eingebauten Äthanolkohlenstoffs auswirkt, bleibt abzuklären.

Die Aktivität der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus scheint je nach Stamm verschieden stark ausgebildet zu sein. Unter den Stämmen aus Ernährungsgruppe 1 weisen die beiden Vertreter von *Ab. aceti* höhere Aktivitäten an Isocitratase und Malatsynthetase auf als *Ab. peroxydans* 109 und *Ab. liquefaciens* 101. Dies äußert sich auch darin, daß die beiden *aceti*-Stämme auf einem Hefeextrakt enthaltenden Medium mehr Äthanolkohlenstoff in die Zellen einbauen als die übrigen Stämme.

Aus den Einbauversuchen mit Äthanol-<sup>14</sup>C und aus Hemmversuchen mit Fluorazetat muß geschlossen werden, daß die Stämme aus Ernährungsgruppen 1 und 2 Äthanol in Anwesenheit von Aminosäuren über den Zitronensäurezyklus assimilieren. Die Aminosäuren werden in diesem Falle nach den entsprechenden Abbaureaktionen zur Aufrechterhaltung der Reaktionen des Zitronensäurezyklus verwendet. Ob ihnen daneben noch eine Rolle in der Stickstoffernährung der Organismen zukommt oder ob bei richtiger Kohlenstoffernährung alle Essigsäurebakterien Aminosäuren-autotroph sind, steht offen.

Auf die Frage nach dem enzymatischen Mechanismus, der die Verwertung von Glucose steuert, kann keine eindeutige Antwort gegeben werden.

In einer ersten Reihe von Versuchen wurde gezeigt, daß kein Zusammenhang zwischen der Aktivität der bekannten Abbauege für Glucose und der Verwertung von Glucose als Kohlenstoffquelle besteht. Das Schlüsselenzym der Glykolyse, F6P-Kinase, konnte in keinem der untersuchten Stämme nachgewiesen werden. Ebenfalls negativ verlief der Nachweis für F6P-Phosphoketolase, das Enzym des hypothetischen F6P-Weges. Diese Tatsache steht im Widerspruch zu den Arbeiten von SCHRAMM, KLYBAS u. RACKER (1958), kann hingegen als Bestätigung neuer Ergebnisse von WHITE u. WANG (1964) angesehen werden, die auf Grund von ausführlichen enzymatischen und radiorespirometrischen Versuchen zum Schluß gekommen sind, daß der F6P-Zyklus beim Glucoseabbau durch *Ab. xylinus* von geringer Bedeutung ist. Bei allen Stämmen von *Ab. xylinus* wurde eine hohe Aktivität der Enzyme des Entner-Doudoroff-Abbauweges festgestellt. Mit dieser ausgeprägten Entner-Doudoroff-Aktivität der *xylinus*-Stämme ergibt sich eine Kongruenz zwischen Ernährungsansprüchen (alle *xylinus*-Stämme benötigen Hefeextrakt für das Wachstum auf Äthanol) und der Anwesenheit eines Enzymsystems. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem ernährungsmäßigen Verhalten der

*xylinus*-Stämme und dem Besitz des Entner-Doudoroff-Weges bleibt jedoch vorläufig verborgen.

Gestützt auf die Angaben der Literatur, wurde als Grundlage für weitere Überlegungen der Pentosephosphat-Zyklus bei allen Stämmen als wichtigster Abbauweg für Glucose vorausgesetzt. In einer zweiten Versuchsreihe unter Anwendung respirometrischer Methoden wurden ein Glucose bevorzugender und ein Äthanol bevorzugender Stamm miteinander verglichen. Es konnten Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, daß der Unterschied in der Enzym-Ausrüstung der beiden Stämme bei den Primärreaktionen der Glucose zu suchen ist. G6P und 6PG wurden nämlich von zellfreien Extrakten der beiden Stämme mit gleicher Geschwindigkeit und gleicher Sauerstoffaufnahme oxydiert. Ließ man dagegen Glucose und Gluconsäure durch ruhende Zellen der beiden Stämme oxydieren, so war beim Glucose bevorzugenden *Ab. mesoxydans* 96 eine deutlich höhere Oxydationsgeschwindigkeit und ein höheres Ausmaß der Oxydation zu beobachten als beim Äthanol bevorzugenden *Ab. aceti* 3. Glucose bevorzugende Stämme scheinen sich von Äthanol bevorzugenden dadurch zu unterscheiden, daß sie besser befähigt sind, extrazelluläre Glucose zu intrazellulärem G6P bzw. 6PG umzuwandeln.

Es wurde daher geprüft, ob sich Unterschiede in den Kinase-Aktivitäten zwischen verschiedenen Stämmen feststellen ließen. Dies war der Fall (Tab. 13). Es konnte aber kein Zusammenhang zwischen den gemessenen Kinase-Aktivitäten und dem Ausmaß der Glucoseverwertung festgestellt werden. Diese Erklärungsmöglichkeit mußte daher aufgegeben werden. Die Ergebnisse der Versuche sind jedoch insofern interessant, als die verwendete Methodik quantitative Vergleiche zwischen den Glucokinase- und Gluconokinase-Aktivitäten der verschiedenen Stämme ermöglichte. So konnte gezeigt werden, daß sich die Stämme auch in bezug auf diese Enzyme in Gruppen einteilen lassen. Als weitere Möglichkeit wurde geprüft, ob schlechte Glucoseverwertung nicht auf geringe Zellpermeabilität für Gluconsäure zurückzuführen sei. Auf Grund von Versuchsergebnissen mußte diese Annahme jedoch ebenfalls ausgeschlossen werden.

In Abb. 8 sind die beiden Ansatzpunkte, in denen Engpässe der Glucoseverwertung vermutet wurden, nochmals schematisch dargestellt. Bei dem ersten war geringe Gluconokinase-Aktivität erwartet worden, bei dem zweiten eine Permeabilitätsschranke für Gluconsäure. Als Folge dieser Engpässe sollte sich Gluconsäure ansammeln, was bei Glucose schlecht verwertenden Stämmen tatsächlich der Fall ist. Im Experiment konnte aber weder die eine noch die andere Annahme bestätigt werden, und es muß nach weiteren Erklärungsmöglichkeiten gesucht werden.

Unter drittens in Abb. 8 ist ein Regulationsmechanismus für die Verwertung von Glucose über den Pentosephosphat-Zyklus dargestellt. Das Funktionieren dieses Mechanismus wurde experimentell nicht nachgeprüft und soll hier im Sinne einer Hypothese besprochen werden. Voraussetzung dafür ist die in Tab. 3 und 12 gemachte Feststellung, daß gutes Wachstum auf Glucose mit weitgehender Oxydation von Glucose zusammenfällt. Daraus wird geschlossen, daß Glucose bevorzugende Stämme einen großen Anteil der vorgelegten Glucose über den Pentosephosphat-Zyklus oxydieren. Die Höhe des Glucoseumsatzes über den Pentosephosphat-Zyklus hängt unter anderem von der NADP-Konzentration ab. Die den Pentosephosphat-Zyklus einleitende Reaktion, die Oxydation von 6PG zu Pentose-

phosphat, geht unter Verbrauch von NADPH<sub>2</sub> vor sich. Lläuft die NADPH<sub>2</sub>-Reoxydation nicht mit genügender Geschwindigkeit ab, so kann die NADP-Konzentration limitierend auf den Pentosephosphat-Zyklus wirken. HOLLMANN (1961) hat darauf hingewiesen, daß der NADPH<sub>2</sub> verbrauchenden Reduktion von Ketogluconsäure zu Gluconsäure bei Essigsäurebakterien in diesem Zusammenhang eine physiologische Bedeutung zugeschrieben werden könnte. Die Bildung von 2-Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure erfolgt durch partikelgebundene, Coenzym-unabhängige Oxydasen ohne Verbrauch von NADP. Bei der Reduktion der Ketogluconsäuren wird hingegen NADPH<sub>2</sub> verbraucht und NADP regeneriert,

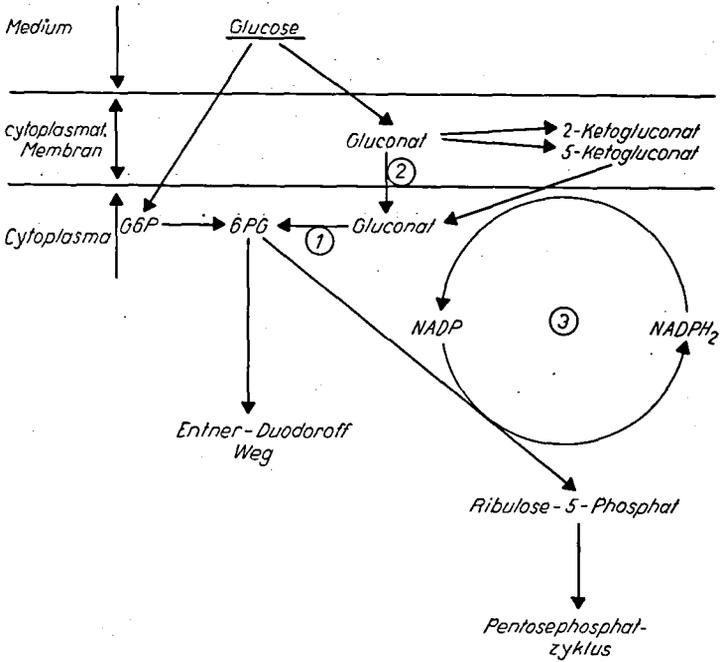


Abb. 8. Hypothesen für Regulationsmechanismen der Glucoseverwertung

das durch die Reaktion der G6P-Dehydrogenase von neuem verbraucht werden kann. Stämme, die dieses Oxydations-Reduktions-System besitzen, befinden sich gegenüber anderen Stämmen im Vorteil. Bei ihnen ist die Reoxydation von NADPH<sub>2</sub> gewährleistet, und die Bedingungen für das Ablaufen des Pentosephosphat-Zyklus in bezug auf die NADP-Versorgung sind erfüllt. In einer experimentellen Bestätigung dieser Hypothese müßte ein Zusammenhang zwischen Besitz des erwähnten Oxydations-Reduktions-Systems und guter Verwertung von Glucose hergestellt werden können. Bis jetzt sind noch keine Versuche in dieser Richtung ausgeführt worden. Es ist aber möglich, daß mit einer Untersuchung dieser Zusammenhänge Klarheit über den Mechanismus der Glucoseverwertung gewonnen werden kann.

#### D. Zusammenfassung

Eine Betrachtung der neueren Literatur über Systematik und Nomenklatur der Essigsäurebakterien führt zur Ansicht, daß die von LEIFSON (1954) vorgeschlagene Einteilung der Essigsäurebakterien in die beiden Gattungen *Acetobacter* und *Acetomonas* gerechtfertigt ist. Auf Grund der durchgeführten Wachstums- und Stoffwechselversuche können zur Frage der Arteeinteilung der Essigsäurebakterien folgende Aussagen gemacht werden:

1. Sowohl die Einteilungsmerkmale der Systematik nach FRATEUR (1950) als auch die zusätzlich geprüften Ernährungsansprüche von 19 Stämmen von Essigsäurebakterien blieben während 80 Passagen und über einen Zeitraum von zwei Jahren konstant.
2. In der Verwendung von zusätzlichen, in der Frateurschen Systematik nicht gebrauchten Eigenschaften zur Charakterisierung der Stämme zeigen sich Möglichkeiten, eine Art durch Merkmale zu beschreiben, die nicht in der An- oder Abwesenheit von einem einzigen, sondern von mehreren Enzymen begründet liegen. In diesem Zusammenhang wurden zellfreie Extrakte der verschiedenen Stämme auf die Aktivität der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus, des Entner-Doudoroff-Weges, einiger Enzyme der Glykolyse und der Kinasen für Glucose und Gluconsäure geprüft. Isocitratase und Malatsynthetase konnten nur bei denjenigen Stämmen nachgewiesen werden, die befähigt sind, auf Hoyers Medium zu wachsen. Die Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges wurden in der Gattung *Acetobacter* stets bei *Ab. xylinus* und nur bei *Ab. xylinus* festgestellt.
3. Es wurde eine Einteilung der Stämme in Ernährungsgruppen durchgeführt, die auf ihrer Fähigkeit, Äthanol als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten, gründet. Ernährungsgruppe 1 (Glyoxylsäurezyklus +, Zitronensäurezyklus +) und Ernährungsgruppe 3 (Glyoxylsäurezyklus —, Zitronensäurezyklus —) bilden zwei homogene Gruppen. Ernährungsgruppe 2 (Glyoxylsäurezyklus —, Zitronensäurezyklus +) umfaßt Stämme aus der *Mesoxydans*- und *Oxydans*-Gruppe nach FRATEUR (1950) und ist sehr heterogen. Die Verwendung des Kriteriums der Glucoseverwertung zur weiteren Unterteilung von Ernährungsgruppe 2 zeigte keine Vorteile gegenüber dem von FRATEUR (1950) verwendeten Merkmal der Ketogenität.

In bezug auf den Stoffwechsel der Essigsäurebakterien interessierten vor allem die Gründe des verschiedenartigen Verhaltens der untersuchten Stämme gegenüber den beiden Kohlenstoffquellen Äthanol und Glucose:

1. Die drei Ernährungsgruppen verwerten Äthanol auf verschiedene Weise. Die Stämme der Ernährungsgruppe 1, Organismen mit Isocitratase- und Malatsynthetase-Aktivität, verwerten Äthanol bei Wachstum auf Hoyers Medium über die Reaktionen des Glyoxylsäurezyklus. Bei Wachstum auf einem komplexen Äthanolmedium scheinen sie einen ähnlichen Stoffwechselweg wie die Stämme der Ernährungsgruppe 2 einzuschlagen. Bilanzversuche mit Äthanol-<sup>14</sup>C und Hemmversuche mit Fluorazetat sprechen dafür, daß die Stämme der Ernährungsgruppe 2 aus Aminosäuren und Bestandteile des Hefeextraktes C-4-Verbindungen gewinnen, welche den

Ablauf des Zitronensäurezyklus und damit die Verwertung von Äthanol ermöglichen. Das Fehlen des Zitronensäurezyklus bei den *Acetomonas*-Stämmen der Ernährungsgruppe 3 erklärt die Tatsache, daß bei diesen Stämmen kein Einbau von Äthanolkohlenstoff in die Zellsubstanz beobachtet werden konnte, diese Stämme also Äthanol wohl als Energie-, nicht aber als Kohlenstoffquelle verwenden können.

2. Bei Wachstum auf Glucose wurden bei verschiedenen Stämmen unterschiedliche Ausbeuten an Zellmaterial festgestellt. Diese Unterschiede in der Glucoseverwertung konnten weder auf den Abbauweg der Glucose noch auf die Glucokinase- oder Gluconokinase-Aktivität der Stämme, noch auf unterschiedliche Zellpermeabilität der Stämme für Gluconsäure zurückgeführt werden.

### Summary

The present paper deals with taxonomy and physiology of the acetic acid bacteria. The work on differentiation of species of acetic acid bacteria resulted in the following conclusions:

1. Not only the criteria for classification according to FRATEUR (1950) but also the nutritional characteristics remained stable over a period of two years for the 19 strains investigated.
2. Strains which are able to grow on Hoyer's medium (ethanol as the only carbon source,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as the only nitrogen source) possess the enzymes of the glyoxylate-cycle. In the genus *Acetobacter* the enzymes of the Entner-Doudoroff pathway were demonstrated only in the species *Ab. xylinus* and in all strains of this species which were examined.
3. Growth experiments revealed marked differences in the utilization of carbon sources (glucose or ethanol) by different strains. As a result of these observations three nutritional groups were distinguished, which differ with respect to their ability to utilize ethanol as the only carbon source. Nutritional group 1 (glyoxylate-cycle present, citric acid-cycle present) and nutritional group 3 (glyoxylate-cycle absent, citric acid-cycle absent) are homogeneous. Nutritional group 2 (glyoxylate-cycle absent, citric acid-cycle present) is heterogeneous and comprises strains of FRATEUR's (1950) *Mesoxydans*- and *Oxydans*-group. An attempt was made to differentiate within group 2 by the ability of its strains to utilize glucose as the only carbon source. This approach, however, showed no advantages over the classification based on ketogenic capacity used by FRATEUR to discern between the *Mesoxydans*-group and the *Oxydans*-group.

With respect to the physiology of the acetic acid bacteria the dissimilar behaviour of different strains towards ethanol and glucose was investigated.

1. The strains of the three nutritional groups differ in their ethanol-metabolism. When grown on Hoyer's medium the strains of group 1 utilize ethanol by the reactions of the glyoxylate-cycle. If they are grown on a complex ethanol-medium they seem to catabolize ethanol by a pathway similar to the one found in the strains of group 2. The results of experi-

ments with ethanol-<sup>14</sup>C and with fluoroacetate indicate that the strains of group 2 transform the amino acids and part of the yeast extract of the medium into compounds which allow the operation of the citric acid-cycle and thereby the utilization of ethanol.

The *Acetomonas*-strains of nutritional group 3 are not able to incorporate the carbon bound in ethanol into cellular material. This can be explained by the lack of an active citric acid-cycle in the strains of the genus *Acetomonas*. Such strains utilize ethanol as a source of energy but not as carbon source.

2. When grown on a glucose-medium, the strains showed different growth yields. These dissimilarities in the ability to utilize glucose could not be attributed to the enzymatic capacities of the strains (glucose-catabolism, kinases for glucose and gluconate) nor to differences in the permeability for gluconate among the strains.

### Literatur

- ALDOUS, J. G., and K. R. ROZEE, *Biochem. J.* **62**, 605—610 (1956). — ARCUS, A. C., and N. L. EDSON, *Biochem. J.* **64**, 385—394 (1956). — ASAI, T., *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **11**, 686—696 (1935). — ASAI, T., and K. SHODA, *J. gen. appl. Microbiol.* **4**, 289—311 (1958). — BERGMAYER, H. U., *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim 1962. — BROWN, G. D., and C. RAINBOW, *J. Gen. Microbiol.* **15**, 61—69 (1956). — BUCHANAN, R. E., R. ST. JOHN-BROOKS, and R. S. BREED (Editors), *J. Bact.* **55**, 287—306 (1948). — COLOWICK, S. P., and H. M. KALCKAR, *J. biol. Chem.* **148**, 117—126 (1943). — COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York 1955. — CONWAY, E. J., and M. DOWNEY, *Biochem. J.* **47**, 347—355 (1950). — COOKSEY, K. E., and C. RAINBOW, *J. Gen. Microbiol.* **27**, 135—142 (1962). — CRANE, R. K., and A. SOLS, in: COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, I, p. 277 (1955). — DE LEY, J., *Antonie van Leeuwenhoek* **24**, 281—297 (1958). — Ders., *J. Gen. Microbiol.* **24**, 31—50 (1961). — DE LEY, J., and R. DOCHY, *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 538—541 (1960). — DE LEY, J., and J. SCHELL, *J. Bact.* **77**, 445—451 (1959 a). — Ders., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 154—165 (1959 b). — Ders., *J. Gen. Microbiol.* **33**, 243—253 (1963). — DIXON, A. H., and H. L. KORNBERG, *Biochem. J.* **72**, 3P (1959). — DUDMANN, W. F., *J. Gen. Microbiol.* **22**, 25—39 (1960). — FEWSTER, J. A., *Biochem. J.* **69**, 582—595 (1958). — FODA, O., and R. H. VAUGHN, *J. Bact.* **65**, 78—82 (1953). — FRATEUR, J., *La Cellule* **53**, 287—392 (1950). — FRIEDEMANN, T. E., and G. E. HAUGE, *J. biol. Chem.* **147**, 415—442 (1943). — GLOCK, G. E., and P. MCLEAN, *Biochem. J.* **55**, 400—408 (1955). — GOLDMAN, C. L., W. LITSKY, M. MANDEL, and H. N. LITTLE, *Can. J. Microbiol.* **4**, 463—468 (1958). — GRAY, C. H., and E. L. TATUM, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **30**, 404—410 (1944). — GROMET-ELHANAN, Z., and S. HESTRIN, *J. Bact.* **85**, 284—292 (1963). — GROMET-ELHANAN, Z., M. SCHRAMM, and S. HESTRIN, *Biochem. J.* **67**, 679—689 (1957). — HALL, A. N., G. A. THOMAS, K. S. TIWARI, and T. K. WALKER, *Arch. Biochem. and Biophysics* **46**, 485—487 (1953). — HAUGE, J. G., T. E. KING, and V. H. CHELDELIN, *J. biol. Chem.* **214**, 1—26 (1955). — HENNEBERG, W., *Zbl. Bakt.* **3**, 223—228 (1897). — HODGKISS, W., J. L. SHIMWELL, and J. G. CARR, *Antonie van Leeuwenhoek* **28**, 357—364 (1962). — HOLLMANN, S., *Nicht-glykolytische Stoffwechselwege der Glucose*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1961. — HUGHES, D. E., *Brit. J. Exper. Path.* **32**, 97—109 (1951). — JANKE, A., *Arch. Mikrobiol.* **41**, 79—114 (1962). — JANKE, A. und M. RÖHR, *Arch. Mikrobiol.* **31**, 106—113 (1958). — JOUBERT, J. J., W. BAYENS, and J. DE LEY, *Antonie van Leeuwenhoek* **27**, 151—160 (1961). — KALBERER, F. und J. RUTSCHMANN, *Helv. Chim. Acta* **44**, 1956—1966 (1961). — KATZNELSON, H., *Canad. J. Microbiol.* **4**, 25—34 (1958). — KRIMIT, M. R., and P. J. LE B. WILLIAMS, *J. Gen. Microbiol.* **31**, 447—449 (1963). — KITOS, P. A., C. H. WANG, B. A. MOHLER, T. E. KING, and V. H. CHELDELIN, *J. biol. Chem.* **233**, 1295—1298 (1958). — KOVACHEVICH, R.,

and W. A. WOOD, *J. biol. Chem.* **213**, 745—767 (1955). — LEIFSON, E., Antonie van Leeuwenhoek **20**, 102—110 (1954). — McDONALD, M. R., in: COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, I, p. 269 (1955). — McILWAIN, H., *J. Gen. Microbiol.* **2**, 288—291 (1948). — McINTOSH, A. F., Antonie van Leeuwenhoek **28**, 49—62 (1962). — MARMUR, J., E. SEAMEN, and J. LEVINE, *J. Bact.* **85**, 461—467 (1963). — MÜLLER, J., Diplomarbeit, ETH., Zürich 1962. — NEUBERG, C. und E. SIMON, *Biochem. Z.* **197**, 259—260 (1928 a). — Dies., *Biochem. Z.* **199**, 232—247 (1928 b). — PASTEUR, L., *Ann. Sci. de l'Ecole Normale Supérieure* **1**, 113—158 (1864). — PETERS, R. A., *Proc. Roy. Soc., B.* **189**, 143—170 (1952). — Ders., *Adv. in Enzymol.* **18**, 113—159 (1957). — PRIEUR, P., *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **244**, 253—255 (1957). — Ders., *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **250**, 1733—1735 (1960). — RAINBOW, C., and G. W. MITSON, *J. Gen. Microbiol.* **9**, 371—375 (1953). — RAO, M. R. R., and J. L. STOKES, *J. Bact.* **65**, 405—412 (1953 a). — Dies., *J. Bact.* **66**, 634—638 (1953 b). — RAO, M. R. R., Ph. D. Thesis, Univ. of Illinois (1955). — RAUEN, H. M., *Biochemisches Taschenbuch*. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956. — REEVES, H. C., and S. J. AJL, *J. Bact.* **79**, 341—345 (1960). — SCHELL, J., Diss. Univ. Gent (1960). — SCHELL, J., and J. DE LEY, Antonie van Leeuwenhoek **28**, 445—465 (1962). — SCHRAMM, M., and S. HESTRIN, *J. Gen. Microbiol.* **11**, 123—129 (1954). — SCHRAMM, M., V. KLYBAS, and E. RACKER, *J. biol. Chem.* **233**, 1283—1288 (1958). — SHIMWELL, J. L., Antonie van Leeuwenhoek **24**, 187—192 (1958). — Ders., Antonie van Leeuwenhoek **25**, 49—67 (1959). — SHIMWELL, J. L., and J. G. CARR, Antonie van Leeuwenhoek **25**, 353—368 (1959). — Dies., Antonie van Leeuwenhoek **26**, 169—181 (1960). — Dies., Antonie van Leeuwenhoek **27**, 65—75 (1961). — SHIMWELL, J. L., J. G. CARR, and M. E. RHODES, *J. Gen. Microbiol.* **23**, 283—286 (1960). — SIBLEY, J. A., and A. L. LEHNINGER, *J. biol. Chem.* **177**, 859—872 (1949). — STERN, J. R., in: COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, III, p. 426 (1957). — STOKES, J. L., and A. LARSEN, *J. Bact.* **49**, 495—501 (1945). — STOUTHAMER, A. H., Antonie van Leeuwenhoek **25**, 241—264 (1959). — Ders., Diss. Univ. Utrecht (1960). — Ders., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 484—500 (1961). — STOUTHAMER, A. H., J. H. VAN BOOM, and A. J. BASTIAANSE, Antonie van Leeuwenhoek **29**, 393—406 (1963). — UNDERKOFER, L. A., A. C. BANTZ, and W. H. PETERSON, *J. Bact.* **45**, 183—190 (1943). — VAUGHN, R. H., in: BERGEY'S *Manual of Determinative Bacteriology*, 7th Edition, Baillière, Tindall and Co., London 1957. — WHITE, G. A., and C. H. WANG, *Biochem. J.* **90**, 408—433 (1964).

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. L. ETTLINGER, Vorstand des Mikrobiologischen Instituts ETH, danke ich herzlich für die tatkräftige Förderung dieser Arbeit. Allen Mitgliedern des Instituts, die mir behilflich waren, spreche ich meinen besten Dank aus.

## Lebenslauf

31. 7. 1936 Geboren in Zürich
- 1943—1949 Primarschule in Küsnacht/ZH
- 1949—1955 Besuch des Freien Gymnasiums in Zürich. Abschluß mit Maturität Typus B
- 1955—1956 Landwirtschaftliches Praktikum in Frankreich
- 1956—1960 Studium an der Abteilung für Landwirtschaft der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Abschluß mit dem Diplom als Ing.-Agr. mit spezieller Ausbildung in agrotechnologischer Richtung im Herbst 1960
- 1960—1961 Forschungsaufenthalt am Israel Institute of Technology, Division of Food- and Biotechnology, Haifa (Israel)
- 1961—1964 Assistent am Mikrobiologischen Institut der ETH. Ausführung der Promotionsarbeit