

ENZYMEN UIT BACTERIËN.

DOOR

R. S. TJADEN MODDERMAN.

Het is thans zeven jaar geleden, dat de Tubingsche hoogleeraar EDUARD BUCHNER, (thans te Berlijn werkzaam) het bewijs leverde, dat de alcoholische gisting niet onmiddellijk tot stand komt door de levende gisteellen, maar door een enzym, een oplosbare eiwitachtige stof, die door het levensproces van het gistplantje aanhoudend gevormd wordt. Door biergist te mengen en te wrijven met kwartzand, verscheurde hij de plantencellen, perste onder een tot 400 à 500 atmosferen klimmenden druk de kleverige massa uit en verkreeg aldus na filtratie een helder vocht, dat het enzym bevatte en suiker in alcohol en koolzuur omzette.

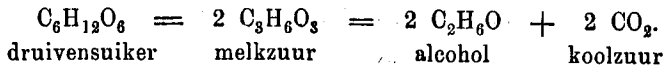
Door deze gewichtige ontdekking was het waarschijnlijk geworden, dat de gebruikelijke verdeeling van de gisting- en rottingprocessen, in die door levende wezens direct teweeggebracht en in die door oplosbare fermenten (enzymen) veroorzaakt, vervallen moest en dat *alle*, zonder onderscheid, op de laatste wijze tot stand kwamen. Het heeft evenwel lang geduurd voordat het bewijs hiervoor ook geleverd werd voor gistingen door bacteriën bewerkt. Trouwens was dit bewijs moeilijk te leveren. Want terwijl verse biergist gemakkelijk uit de bierbrouwerijen verkrijgbaar is in alle verlangde hoeveelheden, moet men de voor de proeven geschikte bacteriën zelf aankweken en dat op niet al te kleine schaal. ¹ BUCHNER zelf, van wien men in

¹ Voor het afzonderen van het enzym moet biergist geheel versch zijn. In oudere gist, zooals het in den handel komt, vindt men daarvan niets meer. Vermoedelijk zal ook in de bacteriën, droog bewaard, het enzym door de cellen verbruikt zijn, voordat zij sterven.

de eerste plaats deze aanvulling zijner ontdekking mocht verwachten, vond met zijn medewerkers aanvankelijk genoeg te bestudeeren aan het enzym uit de biergist, de zoogenoemde zymase.

Doch eindelijk in 't vorig jaar vond hij tijd, in samenwerking met JACOB MEISENHEIMER, om het verlangde bewijs te leveren en wel voor de bacteriën, die de melkzure- en voor die welke de azijnzure gisting veroorzaken.

Chemisch zijn dit zeer verschillende processen. 't Eerste bestaat uit de splitsing van moleculen druivensuiker in het dubbele aantal moleculen melkzuur en schijnt een benadering tot het uiteenvallen van suiker in alcohol en koolzuur:



Inderdaad is melkzuur, waarvan men herhaaldelijk kleine hoeveelheden in gegiste vloeistoffen heeft aangetoond, door sommigen (o. a. NENCKI) als overgangproduct van de alcoholische gisting beschouwd en nu onlangs (*Berl. Ber.*, 37, nummer van 6 Febr. 1904) hebben BUCHNER en MEISENHEIMER de juistheid dezer opvatting weliswaar niet bewezen, maar toch zeer waarschijnlijk gemaakt.

Van geheel anderen aard is het proces van de azijnzure gisting. Daar het neerkomt op de oxydatie van den alcohol door de zuurstof der lucht, heeft het analogie met het ademhalingsproces. Het verdient opmerking, dat — zoo goed als melkzuur — ook het azijnzuur in kleine hoeveelheden bij de alcoholische gisting gevormd wordt en dat zoowel wanneer men van biergist, als van het zymasehoudend perssap uitgaat. Medewerking van de zuurstof der lucht is hierbij *niet* noodig en dit maakt de verklaring van dit goed geconstateerd verschijnsel zeer moeilijk.

Er zijn verscheidene soorten van bacteriën, die de melkzure gisting tot stand doen komen. B. en M. bedienden zich van *Bacillus Delbrücki*, (LEICHMANN) waarschijnlijk identisch met *B. acidificans longissimus* van LAFAR. In 't groot wordt deze bacil gebruikt in branderijen om eenig melkzuur in het beslag te brengen, waardoor de daarna in te leiden alcoholische gisting sneller zou verlopen. Een rein-cultuur werd verkregen van het „Institut für Gährungsgewerbe“ te Berlijn en deze ter kweeking van groote hoeveelheden in gesteriliseerd, sterk moutaftreksel gebracht, waarvan de temperatuur op 40°—45° C. gehouden werd.

Het verkregene, zeer troebele vocht was op geenerlei wijze te filtreeren. Ter afscheiding van de bacteriën werd daarom van een centrifugaaltoestel gebruik gemaakt. Het verkregen bezinksel werd in water verdeeld en andermaal gecentrifugeerd. De hoeveelheid perssap, die men hieruit zou kunnen winnen, zou waarschijnlijk voor de te nemen proeven niet voldoende zijn. Daarom werd van een andere methode gebruik gemaakt, die vroeger reeds met goeden uitslag op biergist was toegepast en, behalve dat men geen verlies aan enzym lijdt, 't welk door het persen nooit volledig in 't sap overgaat, ook het voordeel heeft dat zij veel minder omslachtig is. Zij bestaat hierin, dat men de gist in aceton verdeelt. In deze vloeistof sterven de plantencellen zonder dat het enzym schade lijdt. Toegepast op biergist, krijgt men op deze wijze de zoogenoemde „Aceton-Dauerhefe”, waarop patent genomen is, aangezien zij in de geneeskunde toepassing gevonden heeft. Deze gist heeft dit eigenaardige dat zij, als uit doode cellen bestaande, in een suikeroplossing niet meer groeit en in weerwil van dien toch gisting teweegbrengt. Mettertijd gaat de daarin voorhandene zymase langzaam in werkzaamheid achteruit; na 6 maanden, bij de gewone temperatuur bewaard, verloor zij in een proef 20 pct., in een tweede 19 pct. van haar suiker-ontledend vermogen.

Doch om tot onze melkzuur-bacteriën terug te keeren, BUCHNER en MEISENHEIMER brachten den door centrifugeeren verkregen droesem in aceton, het troebel vocht na eenigen tijd op een filter en wuschen de daarop achterblijvende bacteriën met aceton en aether goed af en droogden daarop in het luchtledig. Aldus was een lichtbruin poeder verkregen, voor elken liter der voedingsvloeistof ruim 1 gram wegend. De kleur is waarschijnlijk door de mout aan de bacteriën meegedeeld.

Dit poeder werd nu nog, ter verbrijzeling van de cellen en voor het aldus toegankelijk maken van het enzym, tien minuten lang, met zijn eigen gewicht aan kwartspoeder en eenig water flink gewreven.

Door mikroskopisch onderzoek overtuigde men zich, dat de bacillen werkelijk verscheurd waren en, door vervolgens een deel van 't poeder in een gesteriliseerd mout-aftreksel te brengen werd geconsta-

1 Verkrijgbaar bij ANTON SCHRODER, München, Landwehrstasse, 45. De toepassing schijnt te berusten op hare „bacteriën-feindliche” werking.

teerd, na 5 dagen staan, bij 42° C., dat geen groei had plaats gehad en de bacteriën dus allen gestorven waren.

De rest van 't poeder diende nu in drie proeven om suiker zoo mogelijk in melkzure gisting te brengen, ten einde aldus het verlangde bewijs te leveren, dat inderdaad de bacteriën-werking door tusschenkomst van een enzym geschiedt. Voor suiker werd rietsuiker genomen, die eerst geïnverteerd werd en daarna gesplitst in melkzuur. Even als vroeger veelal in de proeven met zymase geschiedde, werd de oplossing steriel gehouden door bijvoeging van eenig toluol, dat de enzymwerking niet al te zeer schaadt.

In de twee eerste proeven, resp. bij 27° en 40°—45° C. genomen, met 4—5 gr. poeder en evenveel suiker, in 20 cM³ water + 0,2 cM³ toluol, waren na 2 dagen de vochten merkbaar zuur. Getitreerd met natronloog bleken ze hoeveelheden zuur te bevatten, overeenkomende met respectievelijk 5 en 7 centigram melkzuur.

Veel was dit niet en B. en M. kwamen daardoor op het vermoeden, dat het vrije melkzuur het enzym schaadt, aangezien het bekend is, dat het ook de levende bacteriën in hun werking belemmert. Die van *Bacillus Delbrücki* houdt op bij slechts 0.47 pct. melkzuur en natuurlijk dat reeds kleinere hoeveelheden de gisting verlangzamen. Dat dit werkelijk zoo was bleek uit de derde proef, waarin bij de overige stoffen nog koolzure kalk gevoegd werd, om het te vormen melkzuur te verzadigen. Na 6 dagen was 0.27 gr. koolzuur ontwikkeld, door 't melkzuur uit de koolzure kalk vrijgemaakt, 't geen aan 1.1 gram melkzuur beantwoordt. Men zal dit wellicht nog niet veel vinden, maar men dient in 't oog te houden, dat ook het bijgevoegd toluol het enzym in zijn werking vertraagt. De toevoeging daarvan achterwege laten zou ontwikkeling van de overal aanwezige kiemen van lagere organismen mogelijk maken, waaraan men dan wellicht de melkzuur-vorming zou toeschrijven.

Deze laatste proef diende tevens om nog nader aan te toonen, dat het gevormd zuur werkelijk melkzuur was. Daartoe werd het gegiste vocht met zwavelzuur aangezuurd en het daardoor van de kalk beroofde vrije zuur met aether uitgeschud. De rest, die het laatste na verdamping achterliet, leverde een in water gemakkelijk oplosbaar loodzout, waaruit weer het goed kristalliseerend zinkzout bereid werd. Ten overvloede werd dit laatste volledig geanalyseerd en bleek de samenstelling geheel met die van melkzuurzink overeen te komen.

Gelijk gezegd is, leverden B. en M. ook nog voor de azijnzure

gisting het bewijs, dat de bacteriën in dit proces werkzaam niet direct den alcohol nopen zuurstof uit de lucht op te nemen, maar indirect, door tusschenkomst van een enzym.

Na een paar mislukte proeven, vermoedelijk met reeds te oude bacillen, namelijk met de een paar centimeter dikke huidjes, die *bact. xylinum* op een moutaftreksel vormt, werd versch licht bier genomen (uit de Berlijnsche „Versuchs- und Lehr-Brauerei”), waarin de bierazijn-bacille voorkomt. Ter aankweeking van dezen, werd het bier in een moutextract gebracht, waaraan 4 pct. alcohol en 1 pct. azijnzuur was toegevoegd. In zulk een voedingsvocht kunnen andere organismen niet gedijen. De temperatuur werd op 30° C. gehouden.

Na eenige dagen hadden de bacteriën een dun huidje op de vloeistof gevormd. Voor de afscheiding was centrifugeeren niet noodig; men liet het voedingsvocht eenvoudig afvloeien en bracht de achterblijvende huidjes direct in aceton, om de bacteriën te doden. De behandeling was voorts als boven voor de melkzure bacteriën is opgegeven. Na het wrijven met kwartzand werd het poeder in alcohol van 4 pct. gebracht, onder bijvoeging van toluol en eenige koolzure kalk. De aanwezigheid van deze laatste is van veel belang, want wordt het gevormd zuur niet snel verzadigd, dan komt het proces spoedig tot stilstand.¹ Het na drie dagen gevormd azijnzuur werd uit het kalkzout door distillatie met zwavelzuur afgezonderd en ter indentificeering als zilverzout geanalyseerd.

Uit het medegedeelde mag met vrij groote waarschijnlijkheid worden afgeleid, dat *alle* gisting- en rotting-processen zonder onderscheid op dezelfde wijze tot stand komen, als de vroeger daarvan afgezonderde fermentwerkingen. M. a. w. al die omzettingen schijnen uit te gaan van zoogenoemde enzymen, specifiek van elkaar verschillend, doch hierin overeenkomend dat het alle in water oplosbare, colloïdale stoffen zijn, tot de groote klasse der eiwit-lichamen behoorend.

¹ Dit schijnt niet voor alle azijnzure gistingen te gelden. Het aantal bacteriën, die deze tot stand doen komen, is vrij groot en de zoogenoemde „mycoderma aceti” een collectief-naam voor velen hunner. In vele handboeken vindt men nu opgegeven dat de gisting juist sneller gaat, als eerst een paar procent azijnzuur gevormd is.