

319. C. Neuberg und L. Karczag: Die Gärung der Brenztraubensäure und Oxalessigsäure als Vorlesungsversuch.

[Aus d. Chem. Abteil. des Tierphysiol. Instit. d. Kgl. Landw. Hochschule, Berlin.]
(Eingegangen am 31. Juli 1911.)

Unter dem Namen »zuckerfreie Gärungen« haben Neuberg und Mitarbeiter ¹⁾ die merkwürdige Erscheinung beschrieben, daß eine ganze Reihe nicht zu den Zuckern gehöriger Substanzen mit Hefe in lebhaft »Gärung« geraten. Es ist uns jetzt gelungen, solch einfache Versuchsbedingungen festzustellen, daß man das eigentümliche Phänomen im Laufe einer Vorlesung bequem einem größeren Kreise zeigen kann.

Am schönsten verläuft das Experiment mit Brenztraubensäure und Oxalessigsäure.

In mehr als 100 Einzelversuchen haben wir folgende Arbeitsweise bewährt gefunden.

Man stellt 1-proz. Lösungen von Brenztraubensäure und Oxalessigsäure her. In einem Reagensglase werden etwa 12 ccm einer solchen 1-proz. Lösung mit 2 g Hefe gründlich durchgeschüttelt und sofort in eines der üblichen Gärungsröhren nach Schrötter gefüllt, deren lange Schenkel ca. 10 ccm fassen. Damit ein stärkeres Zurück-sinken der Hefe in den offenen kurzen Schenkel vermieden wird, empfiehlt sich, einige Tropfen Quecksilber als Sperrflüssigkeit einzufüllen. Zur Kontrolle wird ein Versuch mit Hefe in Leitungswasser oder in *m*-Chlornatrium-Lösung angesetzt. Sehr instruktiv ist es auch, gleichzeitig eine Gärprobe mit 1-proz. Traubenzuckerlösung vorzunehmen. Sämtliche Gärröhrchen, deren Füllung keine 5 Minuten in Anspruch nimmt, werden alsdann am offenen Schenkel mit einem aufwärts ragenden Glasrohr durch Schlauchverbindung versehen und alle gleichzeitig in ein breites Becherglas versenkt, das mit Wasser von 38–40° gefüllt ist. Die erwähnten, am offenen Schenkel angebrachten Glasröhren müssen über die Wasseroberfläche reichen. Mit einem Sparbrenner kann man leicht die Temperatur von 38–40° erhalten.

Nach 5 Minuten bemerkt man in den Röhrchen mit Brenztraubensäure, Oxalessigsäure und Traubenzucker lebhaft Entwicklung kleiner Gasblasen. Nach 20–25 Minuten ist das Röhrchen mit Brenztraubensäure zu ca. $\frac{3}{4}$, das mit Oxalessigsäure etwa zur Hälfte ausgegoren. Die Kontrollprobe mit Traubenzuckerlösung lehrt, daß die Gärung

¹⁾ C. Neuberg, Sitzungsber. d. Physiolog. Ges. vom 20. Januar 1911; C. Neuberg und A. Hildesheimer, Bio. Z. **31**, 170 [1911]; C. Neuberg und L. Tir, Bio. Z. **32**, 323 [1911].

von Brenztraubensäure eine sehr schnelle und recht beträchtliche ist und nicht hinter der von Glucose zurückbleibt, während die von Oxalessigsäure etwas schwächer verläuft. In dem Röhrchen mit Hefe und Wasser oder *m*-Chlornatrium-Lösung findet man lediglich die oblige Luftblase, herrührend von der in der Hefe eingeschlossenen Luft.

Natürlich kann man den ganzen Gärungsvorgang im Projektionsbilde beobachten, da das Becherglas mit den darin versenkten Gärröhrchen ja völlig durchsichtig ist. Man sieht dann die Gasentwicklung in den gärenden Flüssigkeiten besonders schön.

Füllt man die Röhrchen mit Brenztraubensäure und Oxalessigsäure allein bezw. mit diesen Substanzen und aufgekochter Hefe, so tritt nicht die geringste Gasentwicklung ein¹⁾. Dadurch ist der Vorgang als eine Wirkung der Hefe gekennzeichnet. Wie in den früheren Mitteilungen²⁾ bereits dargetan ist, läßt sich der Prozeß vom Leben der Hefe trennen. Es handelt sich demnach um einen echten enzymatischen Vorgang.

Die Spaltprodukte, die das Ferment aus Brenztraubensäure und Oxalessigsäure erzeugt, lassen sich nach 20 Minuten mit voller Deutlichkeit nachweisen. Man nimmt die Gärröhrchen aus dem Becherglase und entfernt das aufgesetzte Glasrohr vom offenen Schenkel. Die im letzten angesammelte Flüssigkeit saugt man mit einer Pipette auf und gewahrt dabei bereits starken Aldehydgeruch. Zum Nachweis des entstandenen Acetaldehyds kann man die kleine, durch Hefe getrübe Flüssigkeitsmenge nach Zusatz von 5 ccm Wasser aus einem Kölbchen destillieren. In der übergegangenen, intensiv nach Acetaldehyd riechenden Flüssigkeit kann man letzteren mit allen bekannten Reaktionen nachweisen, oft sogar mit einer klar filtrierten Lösung von essigsaurem *p*-Nitrophenylhydrazin als krystallinisches Derivat isolieren. Noch einfacher ist es, das dem offenen Schenkel entnommene Gärgut mit 5 ccm Wasser zu verdünnen, mit 2 ccm kolloidalem Eisenhydroxyd zu klären und zu filtrieren. In der farblosen Flüssigkeit erhält man dann eine enorme Acetaldehyd-Reaktion nach Rimini, d. h. auf Zusatz einiger Tropfen kalt gesättigter Nitroprussidnatrium-Lösung und von etwas 5-proz. Diäthylamin eine intensive Blaufärbung. Die Reaktion ist streng beweisend für Acetaldehyd.

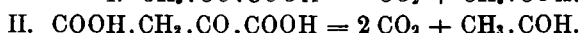
¹⁾ Die völlige Beständigkeit der Brenztraubensäure ist bekannt, aber auch Oxalessigsäure liefert unter den angegebenen Bedingungen keine Spur Gas. Benutzt wurde die bei 152° schmelzende Modifikation, die als Oxymaleinsäure, $\text{CH} - \text{COOH}$
 $\text{C}(\text{OH}) \cdot \text{COOH}$, aufzufassen ist.

²⁾ Neuberg und Mitarbeiter, l. c.

Das zweite, von der Hefe erzeugte Reaktionsprodukt ist das im geschlossenen Schenkel der Gärröhrchen angesammelte Gas. Dasselbe ist reines Kohlendioxyd. Bringt man in den langen Schenkel etwas Kalilauge, so wird das Gas heftig und vollständig absorbiert (bis auf ein minimales, aus Luft bestehendes Bläschen).

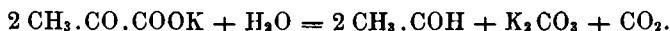
Es handelt sich um die Wirkung eines bisher unbekanntes Enzyms, das Kohlensäure abspaltet und von uns Carboxylase genannt werden soll³⁾.

Die Wirkung der Carboxylase besteht in einer Zerlegung der Brenztraubensäure und Oxalessigsäure in Acetaldehyd und Kohlendioxyd:



Es handelt sich hier um den ersten Fall einer wirklichen enzymatischen Kohlensäure-Abspaltung aus Carbonsäuren. Höchst bemerkenswert ist auch die Bildung eines starken Protoplasmagiftes wie Acetaldehyd als Hauptreaktion durch die Hefe.

Läßt man die Carboxylase statt auf die freien Säuren auf ihre Alkalisalze wirken, so entsteht ein stark alkalisch reagierendes Gemisch, indem ein Teil der erzeugten Kohlensäure als Alkali-carbonat auftritt, z. B.:



Der Aldehyd wird dabei natürlich größtenteils kondensiert. Die enzymatische Bildung von Alkali aus Neutralsalzen ist ein biologisch recht interessanter Vorgang.

Die Carboxylase haben wir in jeder bisher untersuchten Heferasse angetroffen. Für die Demonstration innerhalb kurzer Zeit eignet sich besonders die gärkräftige Reinzuchtheffe D des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin; aber auch gewöhnliche Preßheffe wirkt ebenso, wenn auch innerhalb $\frac{1}{2}$ Stunde nur ungefähr halb so stark.

³⁾ Bezüglich aller Einzelheiten verweisen wir auf unsere spätere ausführliche Mitteilung in der Biochemischen Zeitschrift.
