

**213. Karl Myrbäck und Hans v. Euler; Über die Beteiligung der Kozyrase am Zuckerabbau.**

[Aus d. Biochem. Laborat. d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 2. Mai 1924.)

Die vorliegende Untersuchung betrifft die in diesem Laboratorium wiederholt bearbeitete Frage, zu welcher Phase des Zuckerabbaues, zunächst bei der alkohol. Hefegärung und weiterhin im tierischen Muskel und im pflanzlichen Organismus, die Mitwirkung der Kozyrase (des Hardenschen Koenzyms der Gärung) erforderlich ist.

Methodik: Die Bestimmung der Hefen-Kozyrase erfolgte wie in unseren früheren Mitteilungen<sup>1)</sup> durch volumetrische Messung der per Zeiteinheit von einer gegebenen Menge ausgewaschenen Trockenhefe aus einer glucose- und phosphat-haltigen Lösung entwickelten Menge CO<sub>2</sub>, also durch die Ermittlung der Aktivierung ausgewaschener (an sich gärungs-inaktiver) Trockenhefe. Bezüglich der Einzelheiten der Methodik können wir auf unsere früheren Mitteilungen verweisen. Das Volumen der Lösung betrug 2 ccm und enthielt 0.2 g ausgewaschene Hefe. Die Phosphat-Konzentration betrug 2.5%, die Glucose-Menge 0.1 g, und die Acidität der Lösung entsprach pH = 6.5.

Von den untersuchten Mikroorganismen wurden sowohl lebende Zellen als auch Trockenpräparate angewandt. Im ersten Falle wurde das Trockengewicht getrennt bestimmt. Die abgewogene Zellenmasse wurde in 1 ccm Wasser aufgeschlämmt. Nötigenfalls wurde durch einen kleinen Tropfen sehr verdünnter Salzsäure eine Acidität von pH 3–5 eingestellt. Die verschlossenen Röhren wurden momentan aufgekocht und danach unter jeweiligem Schütteln 15 Min. im Wasserbade bei 60° stehen gelassen. Durch diese Behandlung werden die Zellen getötet, ihr Inhalt wird frei, und die Kozyrase kann ihre Wirksamkeit entfalten. Eine meßbare Zerstörung der Kozyrase durch die Erhitzung tritt nicht ein<sup>2)</sup>. Durch viele Versuche mit Hefe ist sichergestellt, daß die Gesamtmenge der Kozyrase nach dieser Behandlung wirksam ist. Es gelingt z. B. nicht, eine erhöhte Wirkung durch längere Extraktion zu erzielen.

Das Volumen der Gärungs-Kohlensäure wurde bestimmt und der Gehalt an Kozyrase durch den Quotienten  $A_{CO} = \frac{\text{ccm CO}_2/\text{Stunde}}{\text{g Präparat}}$  ausgedrückt<sup>2)</sup>.

Zum Vergleich seien zuerst einige Versuche mit dem gewöhnlichen *I. Saccharomyces cereviciae* (Unterhefe H der Sanct-Eriks-Brauerei, Stockholm) angeführt.

Zu den Versuchen wurde 0.50 g frische Hefe abgewogen (Trockengewicht 0.0163 g) und auf Kozyrase geprüft.

Tabelle 1.

	30	60	90 Min.
ccm CO <sub>2</sub> nach			
ohne Kozyrase	0.0	0.3	0.6
Hefen-Kozyrase	1.5	5.0	7.6
	1.3	4.6	7.5

Wir finden: ccm CO<sub>2</sub>/Stunde (30–60 Min.) = 6.15; A<sub>CO</sub> = 6.15/0.0163 = 377.

<sup>1)</sup> Euler und Myrbäck, H. 131, 179 [1923], 133, 260 [1924].

<sup>2)</sup> H. 123, 93 [1922], 136, 107 [1924].

Hier sei bemerkt, daß diese Hefeprobe ungewöhnlich reich an Kozy-mase war.

Ein Teil derselben Hefe wurde getrocknet: Nach Abpressen wurde die Hefe ohne besondere Vorsicht an der Luft getrocknet, wie es gewöhnlich beim Herstellen größerer Mengen Trockenhefe zu geschehen pflegt. Die Trockenhefe wurde dann wie gewöhnlich auf Kozy-mase geprüft. Dazu wurde 0.05 g benutzt. Trockengewicht 0.046 g.

Tabelle 2.

ccm CO <sub>2</sub> nach	30	45	60	75	90	120	190 Min.
ohne Kozy-mase	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
mit	3.5	6.1	9.0	11.0	12.3	14.3	17.8

ccm CO<sub>2</sub>/Stunde (30—90 Min.) = 8.8; ACo = 8.8/0.046 = 169.

Daraus ersehen wir, daß die Kozy-mase durch diese Trocknung eine Schwächung von etwa 55% erlitten hat. Indessen gelingt es durch vorsich-tiges Trocknen leicht eine Trockenhefe darzustellen, ohne wesentliche Zer-störung der Kozy-mase zu verursachen. Dabei werden kleinere Mengen frischer Hefe kräftig auf Ton abgepreßt und in dünnster Schicht getrocknet, indem man dann und wann die Körner zerdrückt.

## II. Eine alkoholbildende *Torula* aus Kefir.

Die Reinkulturen dieser Hefe, wie auch die der folgenden und die des *Bacillus aerogenes* wurden aus dem bakteriologischen Laboratorium des »Centralanstalten för försöksväsendet på jordbruksområdet« erhalten. Hrn. Prof. Chr. Barthel und Hrn. Assistenten E. Sandberg sei dafür herz-lichst gedankt.

Die Hefe wurde in sterile Molke übergeimpft. Bald begann die Gärung unter starkem Schäumen. Nach 6 Tagen wurde die Hefe abzentrifugiert, gewaschen und auf Ton abgepreßt. Unter dem Mikroskop zeigten sich die Zellen als beinahe kugelig, ziemlich klein, etwa 3  $\mu$  lang und 2  $\mu$  breit. Von der Zellenmasse — Trockengewicht 30% — wurde 0.1 g auf Kozy-mase geprüft. Nachdem der Rest vollkommen getrocknet war, wurden davon 0.05 g geprüft. Trockengewicht 0.049 g.

Tabelle 3.

ccm CO <sub>2</sub> nach	30	60	90	120	150	210	450 Min.
ohne Kozy-mase	0.1	—	—	0.1	—	—	0.1
aus frischer Hefe	—	5.5	7.7	8.3	8.7	9.2	—
aus Trockenhefe	3.7	7.6	9.8	12.0	13.4	15.9	20.8

Für frische Hefe ist ccm CO<sub>2</sub>/Stunde (60—120 Min.) = 3.8, für Trockenhefe (30—90 Min.) = 6.1 und ACo = 127 bzw. 124.

Es wurde also auch in dieser Milchzucker vergärenden Hefe Kozy-mase gefunden. Die Kozy-mase ist durch die schonende Trocknung nicht geschädigt worden.

## III. Eine Milchzucker vergärende *Torula*.

Die Hefe war aus sog. Molkereisäure reingezüchtet. Die Natur der Gärung des Zuckers ist nicht bekannt; jedoch dürfte kaum Alkohol ge-bildet werden. Die Hefe wurde in Molke weitergezüchtet; dabei wurde keine Gasbildung beobachtet. Die Hefe bildete einen Bodensatz, und die über-stehende Lösung war vollkommen klar.

Die Zellen waren langgestreckt, etwa 5  $\mu$  lang und 2.5  $\mu$  breit. Von der frischen Hefe wurde 0.15 g — Trockengewicht 0.05 g — genommen und der Kozy-mase-Gehalt bestimmt.

Tabelle 4.

ccm CO <sub>2</sub> nach	30	60	90	120	210 Min.
ohne Kozyeuse	0.1	—	0.4	—	1.0
0.05 g Hefe	2.6	5.6	7.6	9.2	12.8

5.6 ccm CO<sub>2</sub> wurden während der ersten Stunde entwickelt.  $ACo = 5.6/0.05 = 112$ .

Der Kozyeuse-Gehalt ist also etwa derselbe wie bei der Alkohol bildender Milchzuckerhefe. Leider sind die Gärprodukte der letztbesprochenen Hefe unbekannt, und die Angaben über den Kozyeuse-Gehalt sind weniger verwertbar.

#### IV. *Penicillium glaucum*.

Der Pilz war als weiß-grüne Decke auf Molke gewachsen. Zur Kozyeuse-Bestimmung wurde ein Teil abgepreßt und 0.1 g abgewogen. Wie aus der Tabelle 5 hervorgeht, aktiviert der Kochsaft des Pilzes nicht. Der Versuch mit Hefekochsaft zeigt, daß die ausgewaschene Hefe nicht irgendwie geschädigt war.

Tabelle 5.

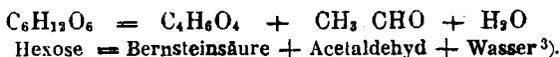
ccm CO <sub>2</sub> nach	60	90	120	420 Min.
ohne Kozyeuse	0.2	0.3	0.4	2.0
Penicillium	0.4	0.5	1.0	3.0
Hefekochsaft	3.5	5.0	6.5	14.0

Im *Penicillium glaucum* ist keine Kozyeuse vorhanden. Dabei erinnert man sich, daß *Penicillium* als ein Erreger der ausgesprochenen Oxydationsgärung zu betrachten ist.

#### V. *Bacterium lactis aerogenes*.

Schließlich haben wir zwei gut bekannte Säuregärung erregende Bakterien untersucht, und zwar eines, das die Hexosen-Kette in zwei Dreikohlenstoff-Ketten sprengt (*Milchsäure-Bacterium*) und eines, das ein andere Aufteilung bewirkt (*Bacillus aerogenes*).

Unter den Gärungsprodukten des *Bacillus aerogenes* findet man hauptsächlich Essigsäure und Bernsteinsäure. Denkbar ist, daß die Sprengung der Hexosen-Kette so verläuft:



Die auftretende Essigsäure, Ameisensäure usw. müßten also als Umwandlungsprodukte des Aldehyds angesehen werden. Wie dem auch sei, so ist auch bei oberflächlicher Betrachtung die Gärung des *Aerogenes* eine ganz andere als die, welche nur Milchsäure durch eine Zweiteilung der Hexose erzeugt<sup>4)</sup>.

Der *Bacillus aerogenes* wurde in Molke gezüchtet. Eine kräftige Gasbildung begann bald. Nach 5 Tagen wurde abzentrifugiert und die Bakterienmasse auf Ton gepreßt. Die Kultur war rein (kurze Stäbchen).

Von der noch ein wenig feuchten Masse — Trockengewicht 50% — wurde 0.1 g auf Kozyeuse geprüft.

Tabelle 6.

ccm CO <sub>2</sub> nach	30	60	90	120	150	180	210 Min.
ohne Kozyeuse	0.1	0.2	—	—	0.2	—	0.3
<i>B. aerogenes</i>	0.3	—	—	0.3	—	—	0.3
Hefekochsaft	0.8	5.5	8.2	9.8	10.7	11.5	12.1

*Bacterium aerogenes* enthält keine Kozyeuse.

<sup>3)</sup> Virtanen, Soc. Scient. Fennica. Comm. Phys. Math. 1, 36.

<sup>4)</sup> Neuberg und Hirsch, loc. cit. S. 429.

VI. *Streptococcus lactis*.

Das Trockenpräparat verdanken wir Hrn. Dr. A. Virtanen, welcher es beschrieben hat<sup>5)</sup>. Das Präparat war etwa einen Monat alt und war Reinkultur. Es enthielt z. B. keine Katalase. Nachdem sich gezeigt hatte, daß die Bakterien große Mengen von Kozympase enthielten, wurden mehrere Versuche ausgeführt. Einige davon sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 7.

ccm CO <sub>2</sub> nach	30	60	90	120	150	180 Min.
ohne Kozympase	0.1	—	—	0.1	—	0.2
0.02 g Bakterien	0.6	2.1	3.7	5.3	6.5	—
0.05 „	0.7	3.3	5.8	—	10.5	—
0.05 „	1.2	3.3	5.8	8.0	—	10.9

ACo. Aus Versuch 2 (30—90 Min.):  $3.1/0.02 = 155$ .

Daß, wie eben gezeigt ist, das Präparat von *Streptococcus lactis* ebensoviel Kozympase enthält, wie sehr gute Präparate von Trockenhefe H, ist gewiß eine bemerkenswerte Tatsache. Wenn man nicht annehmen will, daß die Kozympase auch eine andere Aufgabe in der Zelle hat, liegt der Gedanke nahe, daß die Alkohol- und die Milchsäure-Gärung in ihren ersten Stufen unter der Mitwirkung der Kozympase identisch verlaufen. Dabei wird es auch sogleich auffallen, daß die durch den *Bacillus aerogenes* und den Schimmelpilz erzeugten Gärungen von denen des *Saccharomyces* und des *Streptococcus lactis* grundverschieden sein müssen.

Nach Neuberg<sup>6)</sup> verläuft die erste Phase der Gärung nach der Formel:



Aus dem Methyl-glyoxal entstehen bei der alkohol. Gärung Brenztraubensäure und daraus Acetaldehyd, bei der Milchsäure-Gärung findet eine innere Umlagerung des Brenztraubenaldehyds statt. Aber auch die Gärungen, bei welchen z. B. Vierkohlenstoff-Ketten gebildet werden, will Neuberg mit demselben Schema erklären. Aus dem Aldehyd sollten nämlich durch Aldol-Kondensation längere Ketten gebildet werden können. So erklären z. B. Neuberg und Arinstein die Buttersäure-Gärung durch den *Bacillus butylicus* Fitzianus<sup>7)</sup>. Indessen scheint aus den obigen Versuchen hervorzugehen, daß z. B. bei der Entstehung von Bernsteinsäure die Gärung von Beginn an auf eine andere Weise verläuft als bei den Alkohol- und Milchsäure-Gärungen.

Weitere Versuche über die Beteiligung der Kozympase und des Zymophosphates an der Milchsäure-Gärung wird Hr. A. Virtanen im Anschluß an seine früheren Versuche<sup>8)</sup> mitteilen. Die Versuche werden fortgesetzt.

<sup>5)</sup> H. 134, 300 [1924].

<sup>6)</sup> loc. cit., S. 165.

<sup>7)</sup> Bio. Z. 117, 269 [1921].

<sup>8)</sup> Virtanen, H. 134, 300 [1924].