

**442. Artturi I. Virtanen:
Die Cozymasen bei verschiedenen Gärungen.**

[Aus d. Laborat. d. Butter-Exportgesellschaft Valio m. b. H., Helsinki, Finnland.]
(Eingegangen am 30. September 1925.)

Das Coenzym der alkohol. Gärung, die sog. Cozymase, die von Harden und Young¹⁾ in der Hefe entdeckt wurde, hat in letzterer Zeit ganz besonderes Interesse erweckt, da sie von Meyerhof²⁾ auch im Muskel aufgefunden und von Myrbäck und Euler³⁾ in einigen Mikroorganismen nachgewiesen worden ist. Vor kurzem habe ich dann gezeigt, daß die Milchsäure-Gärung⁴⁾ durch Bakterien nicht ohne Mitwirkung der Cozymase verläuft, und dasselbe gilt auch für die Propionsäure-Gärung⁵⁾.

Sind die Hefe-, Muskel- und Bakterien-Cozymase miteinander identisch? Dies ist eine für das Verständnis der biochemischen Zucker-Abbauprozesse wichtige Frage, die noch nicht genügend klargestellt ist. Zwar könnte man schon nach den früheren Versuchen mit Hefe⁶⁾ annehmen, daß dieselbe Cozymase in pflanzlichen und tierischen Zellen vorkommt, doch scheinen einige neue Versuche dieser Annahme zu widersprechen. In einer Mitteilung⁷⁾, die vor wenigen Monaten in dieser Zeitschrift erschienen ist, habe ich berichtet, daß Insulin die Cozymase in Milchsäure-Bakterien ersetzen kann und folglich als Cozymase wirksam ist. Nach den Versuchen von Euler und Myrbäck⁸⁾ ist dagegen keine Aktivierung der cozymase-freien Hefe durch Insulin zu erkennen. Die verschiedene Wirkungsweise des Insulins bei der alkohol. Gärung und der Milchsäure-Gärung hat mich veranlaßt, die Identität der verschiedenen Cozymasen näher zu prüfen. Die einander widersprechenden Resultate mit Insulin scheinen ohne die Annahme nicht leicht erklärbar zu sein, daß die Cozymasen in der Hefe und in den Milchsäure-Bakterien miteinander nicht identisch sind.

Die Versuche, welche ich zur Entscheidung dieser Frage mit den Cozymasen der Hefe, der Milchsäure- und der Propionsäure-Bakterien angestellt habe, führten jedoch zu dem Resultat, daß in der Hefe, im Muskel und in den Bakterien dieselbe Cozymase vorkommt. Die cozymase-freien Milchsäure-Bakterien werden durch Cozymase-Extrakte aus Hefe, Muskeln und Propionsäure-Bakterien, die Propionsäure-Bakterien durch einen Wasser-Extrakt aus Milchsäure-Bakterien aktiviert. Ferner wird, wie mir Myrbäck mitteilte, die Hefe durch meine Trockenpräparate von *Bacterium casei* s und Propionsäure-Bakterien aktiviert. Die Cozymasen in tierischen und pflanzlichen Zellen können also im allgemeinen sich gegenseitig ersetzen.

Daß dieselbe Cozymase bei verschiedenen Gärungs-Spaltungen des Zuckers tätig ist, erscheint von erheblichem Interesse. Da die Cozymase gerade bei der Veresterung des Zuckers mit Phosphaten (der „Phosphorylierung“) wirksam ist, darf man mit größter Wahrscheinlichkeit annehmen, daß

¹⁾ Proc. Roy. Soc. **77**, 405 [1906]; ²⁾ H. **101**, 165 [1918], **102**, 1 [1918].

³⁾ B. **57**, 1073 [1924]. ⁴⁾ Virtanen, II. **138**, 136 [1924], **143**, 71 [1925].

⁵⁾ Virtanen, Comm. Phys. Math. II, 20 [1925].

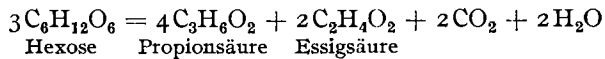
⁶⁾ Meyerhof, loc. cit., Myrbäck und Euler, loc. cit.

⁷⁾ Virtanen, B. **58**, 696 [1925].

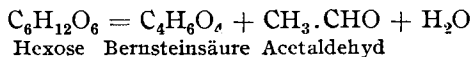
⁸⁾ Chemie d. Zelle u. Gewebe **12**, 57 [1925].

dieselbe Hexose-di-phosphorsäure bei verschiedenen Gärungen entsteht. Welche Bedeutung dieses „Zymo-phosphat“ bei den Gärungen hat, ist allerdings noch nicht klar. Durch die Veresterung wird der Abbau des Zuckers in jedem Falle auf eine ganz bestimmte Richtung eingestellt, und aus diesem Grunde kann man es für wahrscheinlich halten, daß die erste Spaltung des Zuckers sowohl bei der Alkohol- als auch bei der Milchsäure-Gärung dieselbe ist. Welches die primären Spaltprodukte sind — Glycerinaldehyd, Dioxy-aceton oder Methyl-glyoxal⁹⁾ —, ist jedoch noch nicht geklärt.

Bei allen Gärungs-Spaltungen wird aber der Zucker nicht mit Phosphaten verestert, und die Cozymase hat in diesen Fällen keine Bedeutung. Solche Spaltungen sind nach meinen Untersuchungen die komplizierte, von Coli-aerogenes-Bakterien hervorgerufene Gärung¹⁰⁾, deren wichtigsten Endprodukte Kohlendioxyd, Wasserstoff, Essigsäure und Bernsteinsäure neben einer wechselnden, gewöhnlich sehr kleinen Menge Milchsäure sind, ferner die neben der Propionsäure-Gärung verlaufende Bernsteinsäure-Bildung¹¹⁾. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Hexose-Kette in diesen Fällen ganz anders als bei den wichtigen Alkohol- und Milchsäure-Gärungen gespalten wird¹²⁾. Einen Beweis für diese Annahme haben wir in der von Propionsäure-Bakterien hervorgerufenen Gärung. Nach meinen Untersuchungen wird Glykose durch diese Bakterien bis zu etwa 70% nach der Gleichung



zerlegt. Für diese Gärung, welche wahrscheinlich über die Milchsäure verläuft, ist die Cozymase unentbehrlich; hier wird der Zucker mit Phosphorsäure verestert. Außer der Propion- und Essigsäure entstehen bei dieser Gärung auch Bernsteinsäure und Acetaldehyd, entsprechend etwa 20—30% des Zuckers. Diese Bernsteinsäure-Bildung ist schon von den Anfangsstadien ab eine selbständige Gärung. Sie erfordert keine Cozymase; Zucker wird hierbei nicht mit Phosphorsäure verestert, während die Hexose-Kette wahrscheinlich nach der Gleichung



in Verbindungen mit 4 und 2 Kohlenstoffatomen gespalten wird. Natürlich darf man nicht annehmen, daß die Hexose-Kette ohne Phosphorylierung nicht auch in ihrer Mitte gespalten werden kann; darüber haben wir aber noch kein Tatsachenmaterial zur Verfügung.

Das verschiedene Verhalten des Insulins bei der Alkohol- und bei der Milchsäure-Gärung kann man also bisher nicht genügend erklären. Die Annahme, daß das von mir angewandte Insulin-Präparat (Welcome-Insulin) Cozymase als Begleitstoff enthielt und dementsprechend die Milchsäure-Bakterien aktivierte, ist nicht richtig; denn ich habe mit einem Präparat von Welcome-Insulin, das die Milchsäure-Gärung aktivierte, bei der Hefe keine Cozymase-Wirkung gefunden. Der Befund von Euler und

⁹⁾ Über die Vergärbarkeit dieser Verbindungen durch Milchsäure-Bakterien werde ich an anderer Stelle bald berichten.

¹⁰⁾ nach einer noch nicht veröffentlichten Arbeit.

¹¹⁾ Virtanen, *Comm. Phys. Math.* II, 20 [1925].

¹²⁾ vergl. Myrbäck und Euler, *loc. cit.*

Myrbäck, daß Insulin die cozymase-freie Hefe nicht aktiviert, ist gleichzeitig bestätigt worden.

In einer bald folgenden Mitteilung werde ich mit Hrn. Mag. Karström über Kaninchen-Versuche mit der Cozymase aus Milchsäure-Bakterien berichten.

Beschreibung der Versuche.

Hefe-Cozymase und Milchsäure-Bakterien.

Bei den Versuchen mit Milchsäure-Bakterien kam stets ein aktives Trockenpräparat vom *Bacterium casei* s in Anwendung. Die Glykose-Vergärung wurde in einer 0,5-n. Phosphat-Lösung von $p_H = 6.2$ in Gegenwart von Toluol verfolgt. Die Versuchs-Temperatur war 42^0 . Die Zucker-Bestimmungen wurden in filtrierten Proben nach Bertrand ausgeführt. Zu jedem Versuch wurden 2 g des Trockenpräparates in 20 ccm Phosphat-Lösung verwendet.

Ungewaschenes Trockenpräparat			Gewaschenes Trockenpräparat		
Zeit in Stunden	Glykose in 1 ccm g	Verminderung d. Glykose in %	Zeit in Stunden	Glykose in 1 ccm g	Verminderung d. Glykose in %
0	0.0408	—	0	0.0347	—
17	0.0288	29.4	18	0.0345	0

Gewaschenes Trockenpräparat + Cozymase—Hefe-Extrakt

Zeit in Stunden	Glykose in 1 ccm g	Verminderung der Glykose in %
0	0.0294	—
18	0.0221	24.8

Das durch Waschen vollständig inaktivierte Trockenpräparat von *Bacterium casei* hat also durch Zusatz von Wasser-Extrakt aus Hefe beinahe seine ursprüngliche Aktivität wieder erlangt.

Muskelsaft und Milchsäure-Bakterien, Insulin und Milchsäure-Bakterien.

5 g Muskulatur vom Kalb wurden mit 5 g Wasser aufgekocht, sofort abgekühlt und dann filtriert. Die erhaltene Lösung war der angewandte Muskel-Kochsaft. Als Insulin wurde ein frisches Präparat von Welcome-

Ungewaschenes Trockenpräparat			Gewaschenes Trockenpräparat		
Zeit in Stunden	Glykose in 1 ccm g	Verminderung d. Glykose in %	Zeit in Stunden	Glykose in 1 ccm g	Verminderung d. Glykose in %
0	0.0425	—	0	0.0352	—
26	0.0263	38.1	26	0.0307	19.2

Insulin, welches 100 Kaninchen-Einheiten pro 5 ccm enthielt, angewandt. Die Versuchslösung bestand bei allen Versuchen aus 20 ccm 0.5-n. Phosphat-Lösung von $p_H = 6.2$, die 1 ccm Glykose, 2 g Trockenpräparat und 1 ccm Toluol enthielt.

Gewaschenes Trockenpräparat + 5 ccm Muskel-Kochsaft			Gewaschenes Trockenpräparat + 0.8 ccm Insulin		
Zeit in Stunden	Glykose in 1 ccm g	Verminderung d. Glykose in %	Zeit in Stunden	Glykose in 1 ccm g	Verminderung d. Glykose in %
0	0.0276	—	0	0.0352	—
26	0.0186	32.6	26	0.0236	33.0

Das angewandte, dreimal gewaschene Trockenpräparat hat noch bedeutende Mengen Cozymase enthalten. Aus den Versuchen geht jedoch ganz deutlich hervor, daß sowohl Muskel-Kochsaft wie auch Insulin als Cozymase wirksam sind, denn der fehlende Teil Cozymase ist von beiden ersetzt worden.

Die Cozymase von Propionsäure-Bakterien und die Milchsäure-Bakterien.

Das Trockenpräparat von meinem Propionsäure-Bacterium wurde mit Wasser bei Zimmertemperatur im Mörser verrieben und zentrifugiert. Die abgeschiedene klare Lösung wurde dann abgegossen. Mit dem Rückstand wurde diese Behandlung dreimal wiederholt. Die vereinigten Lösungen wurden im Vakuum konzentriert.

Versuchslösung: 20 ccm 0.5-n. Phosphat von $p_H = 6.2$, 1 g Glykose, 2 g Trockenpräparat und 1 ccm Toluol.

Gewaschenes Trockenpräparat			Gewaschenes Trockenpräparat + Waschwasser von Propionsäure-Bakterien		
Zeit in Stunden	Glykose in 1 ccm g	Verminderung d. Glykose in %	Zeit in Stunden	Glykose in 1 ccm g	Verminderung d. Glykose in %
0	0.0375	—	0	0.0269	—
20	0.0370	1.3	20	0.0198	26.4

Die Aktivierung von Milchsäure-Bakterien durch die Cozymase der Propionsäure-Bakterien ist also stark.

Die Cozymase von Milchsäure-Bakterien und die Propionsäure-Bakterien.

Bei der durch Propionsäure-Bakterien hervorgerufenen Gärung verlaufen zwei Spaltungsreaktionen nebeneinander, wie schon oben erwähnt wurde. Die Bernsteinsäure-Bildung erfordert keine Cozymase, und die Glykose wird daher durch Propionsäure-Bakterien auch ohne Cozymase abgebaut. Bei der Propionsäure-Bildung ist die Cozymase dagegen unentbehrlich. Hier wird der Zucker zuerst mit Phosphorsäure verestert, und auf die Cozymase-Wirkung während der Gärung läßt sich deshalb aus der Menge des freien Phosphats schließen.

Versuchslösung: 20 ccm 0.54-n. Phosphat-Lösung von $p_H = 6.2$, 0.85 g Glykose, 2.0 g eines dreimal mit Wasser gewaschenen Trockenpräparats vom Propionsäure-Bacterium, 1 ccm Toluol.

Ohne Zusatz.

Zeit in Stunden	Mg ₂ P ₂ O ₇ in 1 ccm g	Verminderung des Phosphats in %	Glykose in 1 ccm g	Verminderung der Glykose in %
0	0.04372	—	0.0302	—
90	0.04374	0	0.0188	37.7

Cozymase-Zusatz von 2 g Trockenpräparat des Bacterium casei ε.

Zeit in Stunden	Mg ₂ P ₂ O ₇ in 1 ccm g	Verminderung des Phosphats in %	Glykose in 1 ccm g	Verminderung der Glykose in %
0	0.0372	—	0.0258	—
90	0.0338	9.1	0.0129	50.0

Das Resultat ist eindeutig: Ohne Cozymase ist keine, mit Cozymase aus Milchsäure-Bakterien dagegen eine bedeutende Phosphorylierung zu erkennen.

Insulin und Hefe.

Der Einfluß des Insulins auf die alkohol. Gärung wurde mit Hilfe von ausgewaschener Hefe untersucht. Hierbei kamen zwei verschiedene untergärrige Hefen zur Anwendung, von welcher ich die eine Hrn. Dr. Myrbäck verdanke. Die Resultate mit beiden Hefen waren die gleichen. Die Gärung wurde nach Euler in einer 2.5-proz. Phosphat-Lösung von $p_H = 6.4$ verfolgt. Gesamtes Gärungsvolumen 20 ccm, darin 1 g Glykose und 2 g 6-mal gewaschene Trockenhefe.

Die Resultate gehen aus folgender Tabelle hervor:

ccm CO ₂ nach	30	60	90	125	180 Min.
ohne Zusatz	0	0	0	0	0
Hefe-Cozymase (entspr. 2 g Trockenhefe) .	5.7	22.8	56.0	86.3	127.7
1 ccm Insulin	0	0	0	0	0

Insulin hat also bei der Hefe keine Cozymase-Wirkung ausgeübt. Das angewandte Welcome-Insulin war dasselbe Präparat, welches bei dem oben erwähnten Versuch mit Milchsäure-Bakterien in Anwendung gekommen war.