

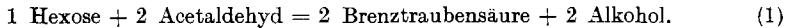
Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten

von Otto Warburg und Walter Christian.

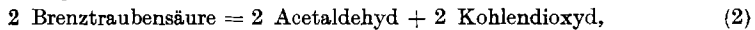
(18. VII. 36.)

Gärung ist, wie Pasteur es ausdrückte, „innere“ Atmung. Denn während bei der Sauerstoffatmung der Zelle Zucker durch ein von aussen zugeführtes Oxydationsmittel, den molekularen Sauerstoff, oxydiert wird, wird bei der Gärung Zucker durch Oxydationsmittel oxydiert, die innerhalb der gärenden Zelle, durch die Gärung, entstehen.

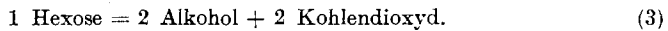
Das Oxydationsmittel der alkoholischen Gärung ist, wie *Carl Neuberg* fand, der Acetaldehyd, der den Zucker zu Brenztraubensäure oxydiert und dabei selbst zu Alkohol reduziert wird:



Da bei Gegenwart von Carboxylase



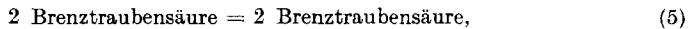
so fallen Brenztraubensäure und Acetaldehyd aus der Bilanz heraus und man erhält, durch Addition der Gleichungen (1) und (2), die Gleichung der alkoholischen Gärung



Entsprechend ist die milchsaure Gärung — nach den Arbeiten von *R. Nilsson*, *G. Embden* und *O. Meyerhof* — ein Vorgang, bei dem Brenztraubensäure die Hexose zu Brenztraubensäure oxydiert und dabei selbst zu Milchsäure reduziert wird:



Da



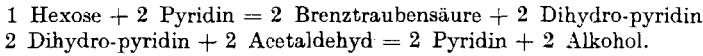
so fällt die Brenztraubensäure aus der Bilanz heraus, und man erhält, durch Addition der Gleichungen (4) und (5), die Gleichung der milchsauren Gärung



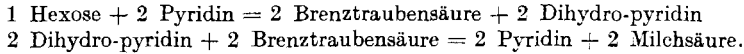
Bei dieser Darstellung haben wir die intermediären Phosphorylierungen, da sie die Oxydationsstufen der reagierenden Molekeln nicht ändern, fortgelassen. Wir haben auch die Frage nicht berührt, wie der Aldehyd oder die Brenztraubensäure entstehen, die zum *Anlauf* der Gärung notwendig sind. Sind diese Oxydationsmittel erst da, so werden sie jedenfalls immer von neuem durch die Reaktionen erzeugt, in denen sie verschwinden — eine wunderbar sinnreiche Einrichtung der Natur zur Erhaltung des Lebens unter Bedingungen, unter denen der molekulare Sauerstoff fehlt.

Betrachten wir Gleichung (1), so können wir die alkoholische Gärung als einen Vorgang auffassen, bei dem Wasserstoff der Hexose auf Aldehyd übertragen wird. Entsprechend können wir, nach Gleichung (4), die Milchsäuregärung als einen Vorgang auffassen, bei dem Wasserstoff der Hexose auf Brenztraubensäure übertragen wird.

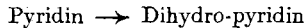
In diesem Vortrag werden wir zeigen, dass die Gärungsgleichung (1) aufzulösen ist in die beiden Gleichungen



Entsprechend ist die Gärungsgleichung (4) aufzulösen in die beiden Gleichungen

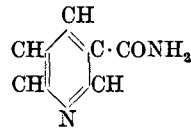


Die Gärungen sind also Pyridin-Katalysen, bei denen der Pyridinring durch den Wechsel



Wasserstoff überträgt.

Das Pyridin, das so wirkt, ist nicht freies Pyridin, sondern eine im Gärungsferment gebundene Pyridinverbindung, das Amid der Nicotinsäure

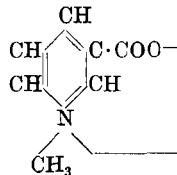


das frei wird, wenn man das Gärungsferment mit Säuren spaltet.

Reversible Hydrierung von einfachen Pyridinverbindungen.

Freies, aus dem Verband des Gärungsferments abgespaltenes Nicotinsäure-amid kann nicht zu der reversiblen Dihydroverbindung hydriert werden und kann deshalb nicht als Wasserstoffüberträger wirken. Platin-Wasserstoff hydriert Nicotinsäure-amid zu der irreversibeln Hexahydroverbindung. Hyposulfit¹⁾ hydriert Nicotinsäure-amid nicht.

Die erste einfache Pyridinverbindung, die wir partiell und reversibel hydrieren konnten, war eine dem Nicotinsäure-amid verwandte Substanz, in der der Pyridinstickstoff 5-wertig ist, das Methylbetain der Nicotinsäure

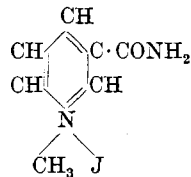


¹⁾ Na₂S₂O₄.

das in der Natur vorkommt und von seinem Entdecker, *E. Jahns*, Trigonellin genannt worden ist.

Trigonellin wird von Hyposulfit in schwach alkalischer Lösung zur Dihydroverbindung hydriert und kann durch ein in der Natur vorkommendes Ferment, das gelbe Oxydationsferment, zur Pyridinverbindung wieder dehydriert werden.

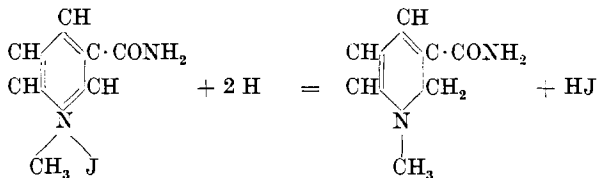
Eine andere einfache Pyridinverbindung, die wir partiell und reversibel hydrieren konnten, steht dem Nicotinsäure-amid noch näher als das Trigonellin. Es ist das Jodmethylat des Nicotinsäure-amids:



Diese Substanz stellte Herr *P. Karrer* für uns her und schlug sie uns zur Prüfung vor.

Das Jodmethylat des Nicotinsäure-amids wird in schwach alkalischer Lösung von Hyposulfit zur Dihydroverbindung hydriert, die, wie das partiell hydrierte Trigonellin, durch gelbes Ferment wieder zur Pyridinverbindung dehydriert werden kann.

Nach *P. Karrer* ist die Gleichung der Hydrierung



Die entstehende Dihydroverbindung ist also *N*-Methyl-ortho-dihydro-pyridin.

Wenn Pyridinverbindungen zu den reversiblen Dihydroverbindungen hydriert werden, tritt im langwelligen Ultraviolett eine charakteristische Absorptionsbande auf, die wir die Dihydrobande nennen. Die Dihydrobande des Trigonellins liegt bei 350 $m\mu$, die Dihydrobande des *Karrer*'schen Körpers liegt bei 360 $m\mu$.

Von der Dihydrobande rührt die weisse Fluorescenz her, die alle reversibeln Dihydro-pyridinverbindungen zeigen, wenn man ihre Lösungen mit ultraviolettem Licht bestrahlt. Da die nicht hydrierten Pyridinverbindungen nicht fluorescieren, so kann man die Hydrierung und Dehydrierung der Pyridinverbindungen im Licht einer Analysenquarzlampe sehen.

Versuch 1. Nicotinsäure-amid-Jodmethylat wird unter Zusatz von Bicarbonat in Wasser gelöst. Die Lösung fluoresciert nicht. Gibt man Hyposulfit dazu, so tritt die weiße Fluorescenz der Dihydroverbindung auf. Zur Zerstörung des überschüssigen Hyposulfits leitet man Sauerstoff durch die Lösung, wobei die Fluorescenz bestehen bleibt: die Dihydroverbindung ist nicht autoxydabel. Die weiße Fluorescenz verschwindet bei Zusatz von gelbem Ferment, dessen Alloxazinring dem Dihydropyridin 2 Wasserstoff-Atome entzieht und ihn so zur Pyridinverbindung dehydriert. — Säuert man eine Lösung der Dihydroverbindung an, so verschwindet die weiße Fluorescenz. Dies ist keine Dehydrierung, sondern eine irreversible Zerstörung.

Pyridin-Nucleotide.

Nicotinsäure-amid kommt in der Natur in Nucleotiden vor, die wir nach ihrer chemisch wirksamen Gruppe „Pyridin-Nucleotide“ nennen. Ein Pyridin-Nucleotid, das 3 Molekeln Phosphorsäure auf 1 Molekel Nicotinsäure-amid enthält, nennen wir „Triphospho-Pyridin-Nucleotid“. Ein Pyridin-Nucleotid, das 2 Molekeln Phosphorsäure auf 1 Molekel Nicotinsäure-amid enthält, nennen wir „Diphospho-Pyridin-Nucleotid“.

Triphospho-Pyridin-Nucleotid wurde 1934 in Dahlem entdeckt. Es ist ein Di-Nucleotid vom Molekulargewicht etwa 800 und enthält zwei Basen, ein Purin- und eine Pyridin-Base. Die Purinbase ist Adenin, die Pyridinbase ist das Amid der Nicotinsäure. Der Gehalt an Adenin beträgt etwa 17%, der Gehalt an Nicotinsäure-amid beträgt 15 bis 16%. Triphospho-Pyridin-Nucleotid ist weitverbreitet in der lebenden Natur und ist ein konstanter Begleiter eines andern, biologisch wichtigen Nucleotids, der *Euler'schen* Co-Zymase.

Co-Zymase ist eine Komponente des von *A. Harden* und *W. J. Young* im Jahr 1904 entdeckten Coferments der Gärung und galt bis 1933, auf Grund von Arbeiten von *H. v. Euler* und *K. Myrbäck*, als ein Adenin-Mono-Nucleotid. Bei der Hydrolyse wurden 28% Adenin gefunden, die Molekulargewichtsbestimmung ergab Werte um 350, das ist das Molekulargewicht der Adenylsäure.

Nach der Entdeckung des Triphospho-Pyridin-Nucleotids schien eine Revision der *Euler'schen* Co-Zymasearbeiten erwünscht, die gleichzeitig in *Euler's* Institut und in Dahlem vorgenommen wurde. *v. Euler* befreite nunmehr seine Co-Zymase-Präparate von der Adenylsäure, aus der seine früheren Präparate vorwiegend bestanden. In Dahlem wurde die Co-Zymase nach einem neuen und einfacheren Verfahren aus roten Blutzellen isoliert.

Das Ergebnis dieser Nachuntersuchung war, dass Co-Zymase kein Adenin-Mono-Nucleotid ist. Sie ist ein Di-Nucleotid vom Molekulargewicht etwa 700 und unterscheidet sich von dem Triphospho-Pyridin-Nucleotid nur durch den Mindergehalt von einer Molekel Phosphorsäure. Co-Zymase ist also Diphospho-Pyridin-Nucleotid. Sie enthält nicht 28%, sondern nur 19% Adenin, aber 17% Nicotinsäureamid. Der richtige Adeningehalt wurde in Stockholm 1935 festgestellt. Die Isolierung des Nicotinsäure-amids der Co-Zymase wurde in Stockholm 1935 versucht, aber erst 1936 in Dahlem erreicht. Wir bemerken, dass *v. Euler* auf das Nicotinsäureamid der Co-Zymase Ansprüche erhebt, die wir, da er keine Analyse vorlegen konnte, nicht anerkennen.

Reversible Hydrierung der Pyridin-Nucleotide.

Der Pyridinring der Pyridin-Nucleotide wird von Hyposulfit zum Dihydro-Pyridinring reduziert. Wie die Dihydroverbindungen unserer Modells-substanzen, so werden die Dihydro-Pyridin-Nucleotide durch gelbes Ferment zu den Pyridin-Nucleotiden dehydriert. Wie bei der Hydrierung der Modells-substanzen tritt bei der Hydrierung der Pyridin-Nucleotide im langwelligen Ultraviolett eine Bande auf. Die Dihydrobande der beiden Pyridin-Nucleotide liegt bei 340 $m\mu$, während die Dihydrobande des Trigonellins bei 350 $m\mu$ und die Dihydrobande des *Karrer'schen* Körpers bei 360 $m\mu$ liegt.

Wie die Dihydro-Derivate der Modells-substanzen, fluorescieren die Dihydro-Pyridin-Nucleotide im ultravioletten Licht weiss. Die nicht hydrierten Pyridin-Nucleotide fluorescieren nicht. Deshalb kann man auch die Hydrierung und Dehydrierung der Pyridin-Nucleotide im Licht der Analysenquarzlampe sehen. Historisch ist zu bemerken, dass wir zuerst die partielle reversible Hydrierung der Pyridin-Nucleotide fanden und erst daraufhin die partielle reversible der einfachen Pyridinverbindungen. Der Weg war also der umgekehrte wie in diesem Bericht.

Versuch 2. Zu einer Lösung von Triphospho-Pyridin-Nucleotid (die nicht fluoresciert) gibt man Hyposulfit, wobei die weisse Fluorescenz der Dihydroverbindung auftritt. Um das überschüssige Hyposulfit zu zerstören, leitet man Sauerstoff durch die Lösung, wobei die weisse Fluorescenz bestehen bleibt: die Dihydroverbindung ist nicht autoxydabel. Die weisse Fluorescenz verschwindet aber bei Zusatz von gelbem Ferment, dessen Alloxazinring das Dihydro-pyridin zum Pyridin dehydriert. — Säuert man eine Lösung des Dihydro-Pyridin-Nucleotids an, so verschwindet die weisse Fluorescenz irreversibel. Dies ist keine Dehydrierung, sondern eine Zerstörung des Pyridins.

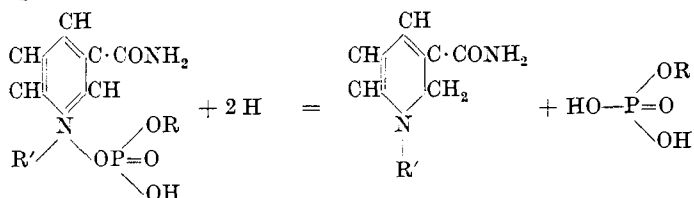
Versuch 3. Wie Versuch 2, aber mit Diphospho-Pyridin-Nucleotid (Co-Zymase). Die Erscheinungen sind genau dieselben, wie bei der Hydrierung und Dehydrierung des Triphospho-Pyridin-Nucleotids.

Versuch 4. Gewinnt man die Pyridin-Nucleotide — wie wir es tun — aus roten Blutzellen, so enthalten sie eine ihnen hartnäckig anhaftende Verunreinigung, die schön fluoresciert. Die Fluorescenz ist in saurer Lösung blau, in alkalischer Lösung grünlich. Die Entfernung dieser Substanz hat uns viel Mühe gemacht. Wir halten sie für eine falsch, vielleicht in para-Stellung zum Stickstoff hydrierte Pyridinverbindung. Wahrscheinlich hat sie biologisch keine Bedeutung.

Bindung des Nicotinsäure-amids in den Pyridin-Nucleotiden.

Hydriert man die Pyridin-Nucleotide zu den reversiblen Dihydroverbindungen, so wird 1 Mol Säure frei. Da die Pyridin-Nucleotide keine andere Säure enthalten, als an Zucker gebundene Phosphorsäure, so kann das bei der Hydrierung freiwerdende saure Wasserstoffatom nichts anderes sein als das H-Atom einer mit einer andern Valenz an Zucker gebundenen Phosphorsäure.

Dies legt die Auffassung nahe, dass das Nicotinsäure-amid in den Pyridin-Nucleotiden ähnlich gebunden ist, wie in dem *Karrer*'schen Jodmethylat. Dann ist die Gleichung der Hydrierung des Nicotinsäure-amids in den Nucleotiden ganz analog der *Karrer*'schen Gleichung



wodurch man sofort versteht, warum das Nicotinsäure-amid in den Pyridin-Nucleotiden mit Hyposulfit reagiert, aber das freie, aus den Nucleotiden gelöste Nicotinsäure-amid mit Hyposulfit nicht reagiert.

R unserer Gleichung ist ein Zuckerrest. R' ist, wie Herr *Karrer* vermutet, gleichfalls ein Zuckerrest, vielleicht derselbe, wie R.

Reversible Hydrierung der Proteinverbindungen der Pyridin-Nucleotide (Fermente).

Pyridin-Nucleotide, in Wasser gelöst, werden zwar von Hyposulfit reduziert, nicht aber von solchen Substanzen, die im Leben als Reduktionsmittel wirken. Insbesondere sind Kohlehydrate oder deren Phosphorsäure-ester nicht imstande, die Pyridin-Nucleotide in wässriger Lösung zu reduzieren.

Setzt man aber zu den Lösungen der Pyridin-Nucleotide spezifische Proteine, die in Hefe oder andern Zellen vorkommen, so vereinigen sich Nucleotid und Protein zu Verbindungen, in denen der Pyridinring der Nucleotide von Kohlehydrat reduziert wird. Diese Pyridin-Nucleotid-Proteinverbindungen sind die wasserstoffübertragenden Fermente, deren Wirkungsgruppe der Pyridinring ist.

Zu den Fermenten, deren Wirkungsgruppe das in Haeminen gebundene Eisen ist, und dem gelben Ferment, dessen Wirkungsgruppe der Alloxazinring ist, tritt so eine dritte Klasse von Fermenten, deren Wirkung auf einfache chemische Reaktionen zurückgeführt ist.

Je nach der Natur des Pyridin-Nucleotids und des spezifischen Träger-Proteins entstehen verschiedene wasserstoffübertragende Fermente. Aus Tri-Phospho-Pyridin-Nucleotid und einem spezifischen Protein entsteht ein Ferment, das Hexose-monophosphorsäure endständig zu Phospho-hexonsäure dehydriert. Aus Diphospho-Pyridin-Nucleotid und einem andern spezifischen Protein entsteht das wasserstoffübertragende Ferment der alkoholischen Gärung. Aus Diphospho-Pyridin-Nucleotid und wieder andern spezifischen Proteinen entstehen wahrscheinlich die wasserstoffübertragenden Fermente der andern Gärungen.

Da die Träger-Proteine nicht fluorescieren und die Fluorescenz der Dihydro-Pyridin-Nucleotide nicht stören, so kann man auch die Hydrierung und Dehydrierung der Fermente im Licht der Analysenquarzlampe sehen.

Versuch 5. Zu einer Lösung von Triphospho-Pyridin-Nucleotid gibt man hexose-monophosphorsaures Kalium. Eine Fluorescenz tritt nicht auf: freies Nucleotid wird von Hexose-monophosphorsäure nicht reduziert. — Zu einer Lösung von Triphospho-Pyridin-Nucleotid gibt man zuerst Träger-Protein und dann hexose-monophosphorsaures Kalium. Die weisse Fluorescenz des Dihydropyridin-Nucleotids tritt auf: mit Protein verbundenes Nucleotid wird von Hexose-monophosphorsäure reduziert. In der Lösung findet man eine dem Pyridin des Nucleotids äquivalente Menge Phospho-hexonsäure. — Reoxydiert man die Dihydroverbindung des Nucleotids mit Sauerstoff und gelbem Ferment zur Pyridinverbindung, so ist der Anfangszustand in bezug auf das katalytische System wieder hergestellt. So kann man, mit beliebig kleinen Mengen Pyridin beliebig grosse Mengen Hexose-monophosphorsäure zu Phospho-hexonsäure oxydieren.

Versuch 6. Ersetzt man in dem Versuch 5 das Triphospho-Pyridin-Nucleotid durch Diphospho-Pyridin-Nucleotid (Co-Zymase) und das Träger-Protein durch ein anderes spezifisches Protein, so

tritt wieder bei Zusatz der Hexose-mono-phosphorsäure die weisse Fluorescenz des Dihydro-pyridins auf. In der Lösung findet man aber jetzt nicht Phospho-hexonsäure, sondern Brenztraubensäure.

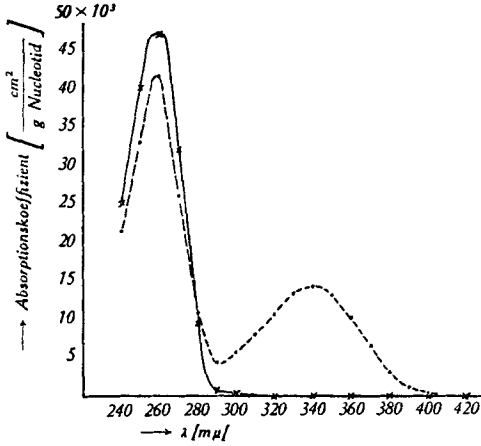


Fig. 1.

Triphospho-Pyridin-Nucleotid, mit Hyposulfit hydriert.

x—x nicht hydriert
•---• hydriert

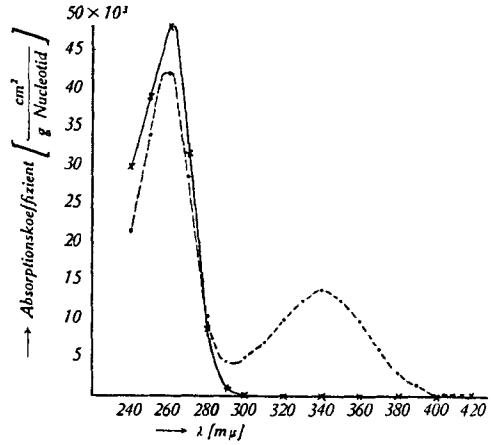


Fig. 1a.

Triphospho-Pyridin-Nucleotid, als Ferment mit Hexose-monophosphorsäure hydriert

x—x nicht hydriert
•---• hydriert

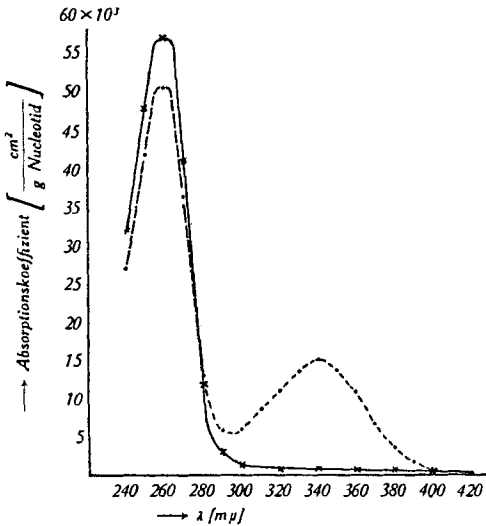


Fig. 2.

Diphospho-Pyridin-Nucleotid, mit Hyposulfit hydriert

x—x nicht hydriert
•---• hydriert

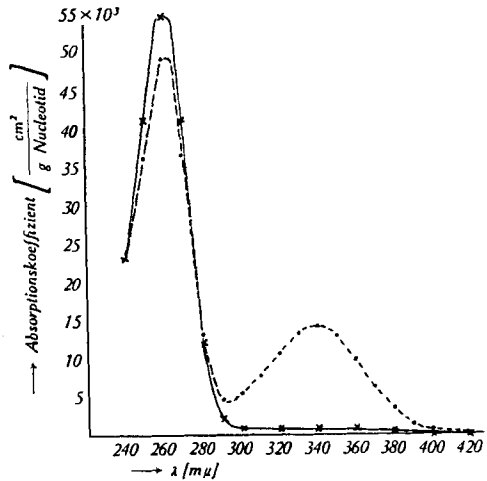


Fig. 2a.

Diphospho-Pyridin-Nucleotid, als Ferment mit Hexose-monophosphorsäure hydriert

x—x nicht hydriert
•---• hydriert

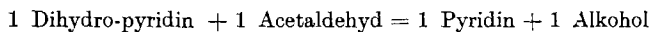
Dass die weisse Fluorescenz, die bei den Ferment-Versuchen auftritt, wirklich von dem hydrierten Pyridin der Nucleotide herührt und von nichts anderem, wird bewiesen durch die Messung der Ultraviolett-Spektren, die auftreten einerseits bei der Hydrierung der Pyridin-Nucleotide in wässriger Lösung mit Hyposulfit und andererseits bei der Hydrierung der Fermente durch Kohlehydrat. Vergleicht man die Abbildung 1 mit 1a und 2 mit 2a, so sieht man, dass die bei der Reduktion der Fermente auftretenden langwelligen Ultraviolettbanden nach Lage und Höhe mit den bei der Reduktion durch Hyposulfit auftretenden Dihydro-pyridinbanden übereinstimmen.

Dehydrierung durch Acetaldehyd.

Versuch 7. Zu der weiss fluorescierenden Lösung des hydrierten Diphospho-Pyridin-Nucleotids, die durch Reduktion des Ferments mit Hexose-monophosphorsäure entstanden ist, gibt man Acetaldehyd. Sofort verschwindet die Fluorescenz und die Lösung enthält Alkohol: der Acetaldehyd hat das Dihydro-pyridin zum Pyridin dehydriert und ist dabei selbst zu Alkohol hydriert worden. Dies also ist die chemische Reaktion, durch die der Alkohol bei der alkoholischen Gärung entsteht.

Zur quantitativen Untersuchung der wichtigen Reaktion bringt man die Fermentlösung, in der das Nucleotid von Kohlehydrat hydriert und von Acetaldehyd dehydriert wird, vor die lichtelektrische Zelle und misst in dem Spektralbezirk der Dihydrobande, bei $340\text{ m}\mu$, das Auftreten der Lichtabsorption bei der Hydrierung und das Verschwinden der Lichtabsorption bei der Dehydrierung. In Abbildung 3 ist ein solcher Versuch graphisch dargestellt.

Zur Zeit $t = 0$ (Abbildung 3) wird die Hexose-monophosphorsäure zugesetzt. Dann steigt die Lichtabsorption, bis alles Nucleotid zur Dihydroverbindung hydriert worden ist. Setzt man jetzt ebensoviel Acetaldehyd zu als die Fermentlösung Dihydro-pyridin enthält, so verschwindet die Lichtabsorption, wodurch die Gleichung



verifiziert ist. — Enthält die Fermentlösung überschüssige Hexose-monophosphorsäure, so steigt (Abbildung 3), nachdem der Aldehyd verbraucht ist, die Lichtabsorption wieder an, kann durch Aldehyd wieder zum Verschwinden gebracht werden und so fort, bis die gesamte Hexose-monophosphorsäure vergoren ist.

Dass wirklich die ganze Gärung über die hier gezeigten Pyridin-Reaktionen läuft, folgt aus dem *Harden-Young*'schen Versuch vom Jahre 1904: dass die Gärung aufhört, wenn man die Co-Zymase aus einer gärenden Flüssigkeit herausnimmt.

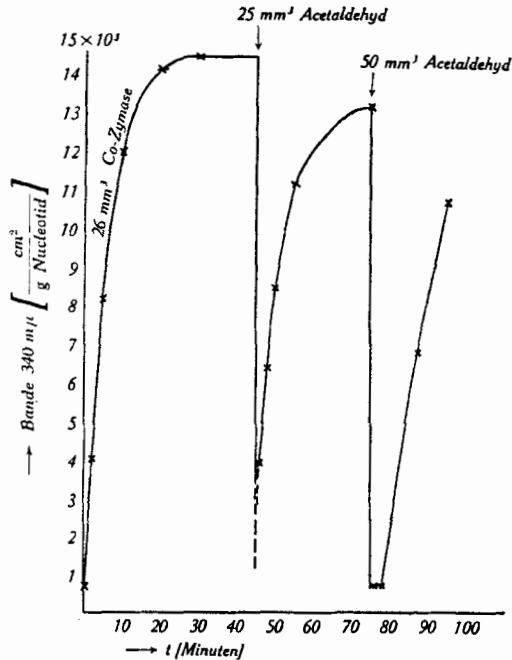


Fig. 3.

Hydrierung und Dehydrierung des Pyridins im Gärungsferment. Ordinaten: Höhen der Dihydrobande des Diphospho-Pyridin-Nucleotids (Co-Zymase)

Andere Pyridin-Katalysen.

Zum Schluss sei bemerkt, dass nach den Untersuchungen von *v. Euler*, *von Wagner-Jauregg* und andern die meisten fermentativen Dehydrierungen nur dann vor sich gehen, wenn man den Lösungen von Protein und Substrat eines der beiden Cofermente zusetzt, die nunmehr als Pyridin-Nucleotide erkannt sind. Es ist im einzelnen noch nicht nachgewiesen, kann aber wohl kaum anders sein, als dass alle diese Dehydrierungen Pyridin-Katalysen sind.

Kaiser Wilhelm-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem.