

# DIE NATURWISSENSCHAFTEN

24. Jahrgang

30. Oktober 1936

Heft 44

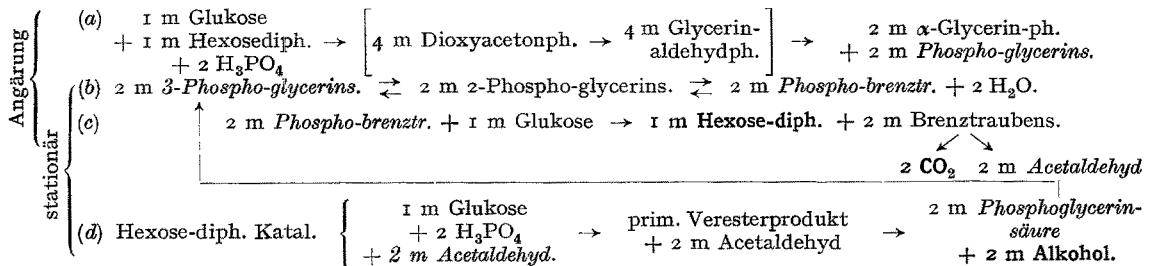
## Neuere Versuche über zellfreie alkoholische Gärung<sup>1</sup>.

Von O. MEYERHOF, Heidelberg.

Die Phosphorylierung des Zuckers als einleitende Reaktion der Gärung und das Vorhandensein eines Coferments der Gärung, diese beiden grundlegenden Erscheinungen des biologischen Zuckerzerfalls, sind bekanntlich von ARTHUR HARDEN vor etwa 30 Jahren entdeckt worden. Auf diese beiden Entdeckungen fällt durch die Forschungen der letzten Jahre ein neues Licht. Hierüber möchte ich kurz berichten, und zwar einmal über den Zerfall des phosphorylierten Zuckers in kleinere phosphorhaltige Bruchstücke, und zweitens über die Rolle, die diese Phosphorylierung für den Eingriff des Coferments in die Gärungsreaktionen spielt.

Was das erstere betrifft, so konnte ich auf Grund gemeinsamer Arbeiten mit K. LOHMANN und W. KIESSLING kürzlich 2 Schemata für die Intermediärreaktionen der Gärung und der Milchsäurebildung vorlegen, von denen das erste hier wiedergegeben ist.

### Neues Gärungsschema (1935).



Ich kann auf die Begründung dieses Schemas und die verschiedenen Zwischenreaktionen hier nicht im einzelnen eingehen und hebe nur die Punkte hervor, die uns im folgenden noch beschäftigen sollen.

Zunächst zerfällt der als Hexosediphosphat veresterte Zucker, wie es in Gleichung a dargestellt ist, gleichzeitig mit sich neu veresterndem Zucker oder auch für sich allein in Triosephosphorsäuren: Dioxyacetonphosphorsäure und Glycerinaldehydphosphorsäure. Auf diese Reaktion werde ich sogleich näher eingehen. Es wandelt sich dann das durch Dismutation entstandene Oxydationsprodukt der Triosephosphorsäuren, die 3-Phosphoglycerinsäure, auf dem Wege über 2-Phosphoglycerinsäure in Phosphobrenztraubensäure um. Die Phosphobrenztraubensäure zerfällt mittels

einer merkwürdigen Umesterung in Brenztraubensäure, während ein weiteres Zuckermolekül die freiwerdende Phosphorsäure aufnimmt und zu Hexosediphosphat wird. Auf diese Reaktion komme ich im zweiten Teil zurück. Die Brenztraubensäure zerfällt dann carboxylatisch in Kohlensäure und Acetaldehyd. Der Acetaldehyd reagiert im stationären Zustand der Gärung mit neu sich veresternder Glukose auf dem Wege über Triosephosphorsäure zu Phosphoglycerinsäure, während er selbst zu Alkohol reduziert wird.

Ich darf hier in Parenthese ein eigenartiges Mißverständnis erwähnen, das auch in jüngster Zeit wieder aufgetaucht ist: daß nämlich dieser Zerfallsweg über die Phosphorsäureester nur in zellfreiem Extrakt, in abgetöteter Hefe usw. eingeschlagen würde, aber nicht in lebender Hefe und lebenden Mikroorganismen. Natürlich muß man, um zu einer Anhäufung der Zwischenprodukte zu kommen, die normale enzymatische Ver-

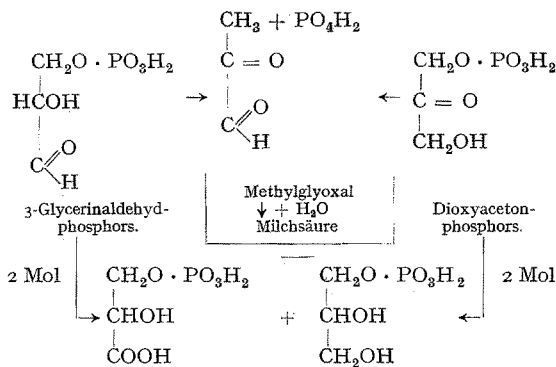
knüpfung des Stoffwechsels der lebenden Zelle unterbrechen, denn es ist ein Widerspruch, zu erwarten, daß in einer lebenden Zelle im stationären Zustand sich ein Zwischenprodukt anreichern könnte. Wenn man aber durch eine derartige Unterbrechung der Reaktionskette, etwa durch Herauslösung der Fermente aus der Zelle, durch Entfernung von Cofermentbestandteilen, durch spezifische Hemmungs- oder Abfangmittel die Reaktionskette unterbricht und dadurch sich Zwischenprodukte anhäufen, so wird nach unserer festen Überzeugung durch solche Mittel nur das zutage gefördert, was sich in der lebenden Zelle unsichtbar abspielt, wo jedes Zwischenprodukt ebenso rasch wieder umgesetzt wird wie es entsteht. Unter entsprechender Abänderung der Reaktionsgeschwindigkeiten muß das Gärungsschema daher auch für die lebende Zelle gelten.

Ich komme jetzt auf den einleitenden Zerfall der Hexosephosphorsäure zurück. Während Hexosemonophosphorsäure durch dialysierten, coferment-

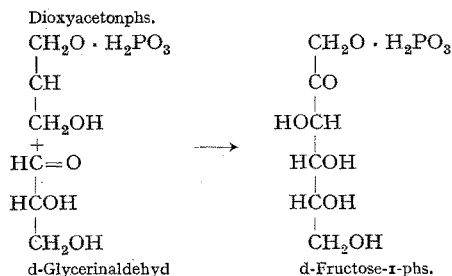
<sup>1</sup> Vortrag, gehalten am 30. Juli 1936 auf dem II. Internationalen Kongreß für Mikrobiologie in London.

Aus dem Institut für Physiologie am Kaiser Wilhelm-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg.

freien Hefeextrakt nicht angegriffen wird, zerfällt Hexosediphosphorsäure, wie ich mit K. LOHMANN fand, in einer reversiblen Reaktion in 2 Moleküle Dioxyacetonphosphorsäure. Andererseits läßt sich zeigen, daß synthetische Glycerinaldehydphosphorsäure nach H. FISCHER von dialysiertem Hefe- und Muskelextrakt rasch in Dioxyacetonphosphorsäure umgewandelt wird, wobei ein Gleichgewicht besteht, das weit nach der Seite der Ketotriose verschoben ist. Die chemische Verwandtschaft beider Triosephosphorsäuren, die leicht in Methylglyoxal hydrolysiert werden, ersieht man aus den Formeln:



Bisher zogen wir aus diesen verschiedenen Reaktionen den Schluß, daß die Zerfallskette von Hexosediphosphat über Dioxyacetonphosphat zu Glycerinaldehydphosphat führt, das dann durch Oxydation der Aldehydgruppe in Phosphoglycerinsäure übergeht. Neue Versuche führen aber zu einer anderen Auffassung. Es zeigte sich, daß die kohlehydratspaltenden Extrakte, sowohl der Hefe wie der tierischen und pflanzlichen Gewebe, ein Ferment enthalten, das allgemein Aldehyde mit Dioxyacetonphosphorsäure unter Aldolkondensation vereinigt. Wir nennen dieses Ferment „Aldolase“. Mit dieser Aldolase lassen sich die verschiedensten Ketosephosphorsäuren synthetisieren, je nach dem benutzten Aldehyd, wie Formaldehyd, Acetaldehyd, Propionaldehyd, Glykolaldehyd, Milchsäurealdehyd usw., Phosphorsäureester, von denen K. LOHMANN eine große Zahl in Substanz dargestellt hat. Besonders interessant ist für uns die Kondensation von Glycerinaldehyd mit Dioxyacetonphosphorsäure. Es ist nicht nötig, von isolierter Dioxyacetonphosphorsäure auszugehen. Wir benutzen Hexosediphosphat, setzen dialysierten Hefeextrakt oder Muskelextrakt hinzu und Gly-

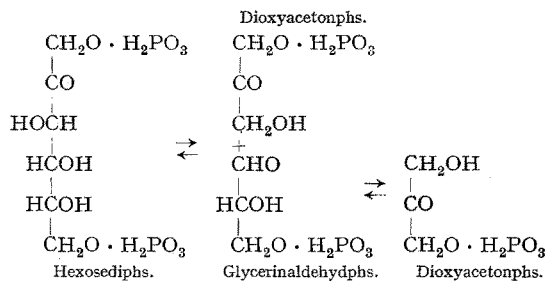


cerinaldehyd. Dieser reagiert dann mit der aus Hexosediphosphat entstandenen Dioxyacetonphosphorsäure und bildet Hexose-1-Phosphorsäure. Wenn wir d-Glycerinaldehyd benutzen, der von den Herren FISCHER und BAER in Basel dargestellt ist, bekommen wir reine d-Fruktose-1-Phosphorsäure, die identisch ist mit der von ROBISON und TANKÓ phosphatisch aus Hexosediphosphorsäure erhaltenen Verbindung. Nehmen wir racemischen Glycerinaldehyd, so reagiert die l-Glycerinaldehydkomponente zu l-Sorbose-1-phosphorsäure.

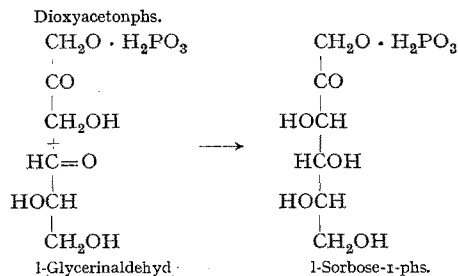
Diese Reaktion läßt sich im Polarisationsrohr verfolgen, weil die entstandenen Ketose-1-phosphorsäuren stark linksdrehend sind. Dies zeigt Fig. 1 für 2 Temperaturen, wo der Gang der Drehung ( $\alpha$ ) gleichzeitig verfolgt ist mit der chemischen Bestimmung des Hexose-1-Phosphats (die Kurven gelten für gemischtes Ketose-1-Phosphat, doch ist der Verlauf mit reinem Fruktose-1-Phosphat bei höherer absoluter Drehung praktisch derselbe).

Diese Aldolkondensation von Dioxyacetonphosphorsäure mit Aldehyden, insbesondere mit Glycerinaldehyd, führt uns dazu, das triosephosphorsäurebildende Ferment selbst als eine Aldolase anzusehen und nun die reversible Bildung der Triosephosphorsäure so zu formulieren, wie es auf der folgenden Formel

*Hexosediphs. = 2 Dioxyacetonphs.*



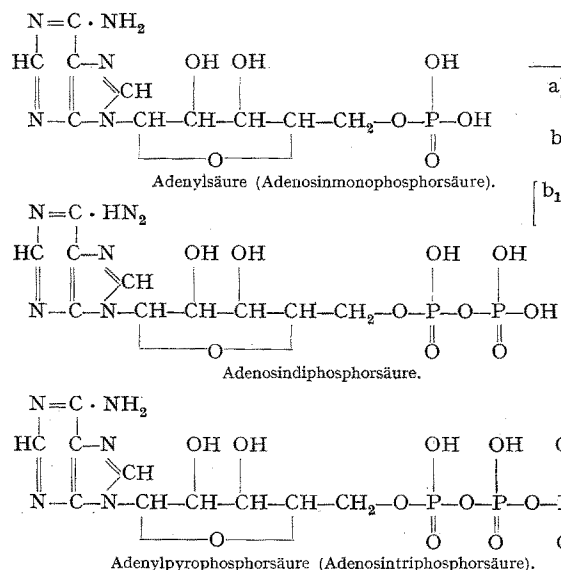
dargestellt ist. Die reversible Zerfalls- und Synthesereaktion findet statt zwischen Hexosediphosphat einerseits und je 1 Mol Dioxyacetonphosphat und 1 Mol Glycerinaldehydphosphat, so wie es von EMBDEN bereits, in Analogie zu der FISCHERSCHEN Aldolkondensation der freien Triosen zu Fruktose, formuliert war. In einer zweiten Reaktion wandelt sich dann 1 Mol Glycerinaldehydphosphorsäure zu Dioxyacetonphosphorsäure um, weil das Gleichgewicht zwischen beiden nach der Seite der Dioxyacetonphosphorsäure liegt. Die thermodynamische



Untersuchung dieser interessanten Reaktion zeigte, daß die starke negative Wärmetönung der Zerfallsreaktion, die wir bereits vor 2 Jahren festgestellt hatten, auf den ersten Reaktionsabschnitt entfällt; dagegen ist die Umwandlung von Glycerinaldehydphosphorsäure in Dioxyacetonphosphorsäure thermisch nahezu neutral.

Im Gegensatz zur rein chemischen Aldolkondensation der Triosen mit schwachem Alkali gelingt die enzymatische Kondensation nicht mit freiem Dioxyaceton, sondern nur mit dem phosphorylierten. Daher kann man auf diesem Wege nicht durch Kondensation von Dioxyaceton mit Glycerinaldehydphosphorsäure zur gewöhnlichen Fruktose-6-Phosphorsäure (NEUBERG-Ester) kommen. Diese wird vielmehr in dialysiertem Enzymextrakt nur durch Abspaltung einer Phosphorsäuregruppe aus Hexosediphosphat erhalten.

Ich möchte jetzt auf einige andere Teilreaktionen der Gärung eingehen, und zwar solche, die der Mitwirkung des Coferments bedürfen. In allerneuester Zeit hat ja die Erforschung des chemischen Baues der HARDEN-EULERSCHEN Cozymase bedeutende Fortschritte durch OTTO WARBURG gemacht, indem als Bestandteil neben dem schon vor längerer Zeit von H. v. EULER darin entdeckten Adeninnucleotid (Adenylsäure) noch ein Nicotinsäureamid-Nucleotid aufgefunden wurde. Aber unabhängig von diesen Forschungen H. v. EULERS und WARBURGS war schon vor 6 Jahren in unserem Institut von K. LOHMANN festgestellt, daß freie Adenylsäure in reversibler Weise zwei leicht hydrolysierbare Phosphorsäuregruppen addiert und dabei in Adenylpyrophosphorsäure (Adenosintri-phosphorsäure) übergeht, und zwar über ein neuerdings von K. LOHMANN isoliertes Zwischenglied, die Adenosindiphosphorsäure.



Dabei wurde dieses Adenylsäuresystem, neben Mg-Ion, als das Coferment der Milchsäurebildung

erkannt und die Funktion desselben darin gesehen, daß es seine bewegliche Pyrophosphorsäuregruppe auf Zucker umestern kann, wobei Hexosephosphorsäuren entstehen und Adenylsäure zurückbleibt, und daß umgekehrt dann die phosphorylierten Spaltprodukte der Zucker unter Abgabe von Phosphat die freie Adenylsäure wieder zu Adenylpyrophosphorsäure rephosphorylieren. Diese Vor-

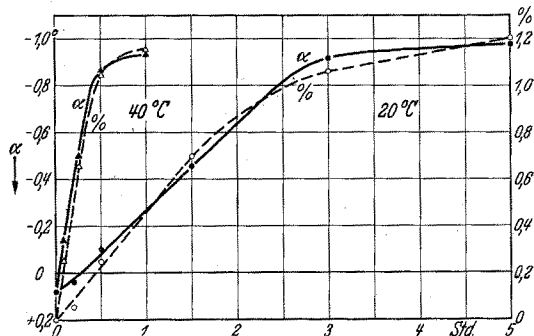
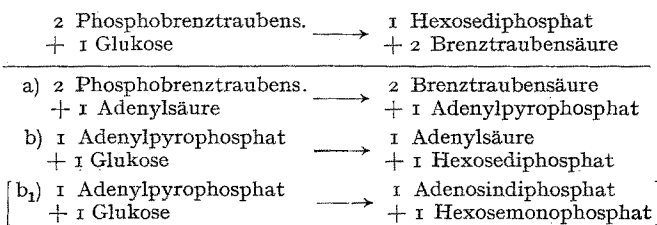


Fig. 1. Bildung von Ketose-1-Phosphat bei 40 ° C und 20 ° C in Gewichtsprozent. α = gemessene Drehung.

stellung ließ sich in einer großen Zahl von Fällen teils in unserem eigenen Laboratorium, teils in dem von PARNAS in Lwow sowie noch in anderen näher präzisieren und führte zu einem Verständnis für die Rolle des Adenylsäuresystems als Coferment. Eine besonders interessante Reaktion dieser Art ist die von W. KIESSLING und mir untersuchte rasche Umesterung der Phosphobrenztraubensäure mit Glukose, die schon in unserem Gärungsschema vorkam. Diese Reaktion zerfällt in die hier wiedergegebenen Teilreaktionen a und b und evtl. als weitere Zwischenreaktion b<sub>1</sub>, so daß



eine äußerst kleine Menge Adenylsäure wie ein echter Katalysator einen beliebig großen Zerfall der Phosphobrenztraubensäure herbeiführen kann und dabei das Phosphat von Phosphobrenztraubensäure auf Glukose überträgt. Die gleiche Umesterung kann nun, wie sowohl im Laboratorium von H. v. EULER wie auch in unserem gezeigt wurde, durch gereinigte Cozymase katalysiert werden, ja diese ist sogar in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit der Adenylsäure überlegen. Durch Umesterung von Phosphobrenztraubensäure nach Gleichung a gelangt man zu einem Cozymasepyrophosphat, das eine definierte Verbindung darstellt und von W. KIESSLING als saures Natriumsalz isoliert werden konnte. Dieses Cozymasepyrophosphat verhält sich ähnlich wie

freies Adenylpyrophosphat, ist aber noch reaktionsfähiger und unbeständiger.

Ein prinzipieller Unterschied von Cozymase und Adenylsäure tritt erst zutage, wenn wir die Vergärung der Phosphobrenztraubensäure in Gegenwart von Glukose ohne Vergiftung des Systems mit Fluorid oder Jodessigsäure untersuchen. In Übereinstimmung mit v. EULER finden wir nun, daß die Vergärung mit Adenylsäure stehenbleibt, wenn die Phosphobrenztraubensäure zerfallen ist, mit Cozymase aber weitergeht, indem jetzt der veresterte Zucker vergärt. Man kann nun direkt zeigen, daß die Oxydoreduktion, die nach O. WARBURG an das Nicotinsäureamid geknüpft ist, durch Adenylsäure allein nicht ermöglicht werden kann. Das zeigen 2 weitere Figuren nach Versuchen von P. OHLMEYER. In Fig. 2 ist die Oxydoreduktion zwischen Glukose und Acetaldehyd in Gegenwart von Phosphat dargestellt, die Haupt-

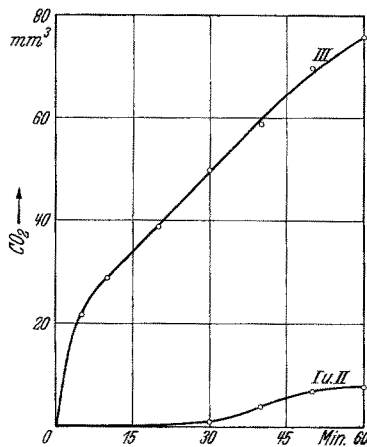


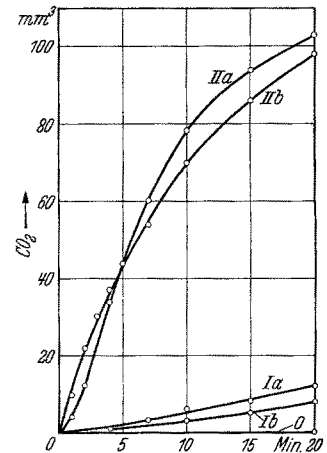
Fig. 2. Oxydoreduktion von Glukose mit Acetaldehyd. (cf. Text.)

reaktion des stationären Zustands: in fluoridversetztem Hefemazerationssaft führt sie zur Anhäufung von Phosphoglycerinsäure unter gleichzeitiger Reduktion des Acetaldehyds zu Alkohol. Die in der Figur wiedergegebenen Versuche sind mit 15 Stunden dialysiertem Mazerationssaft ausgeführt und die Phosphoglycerinsäurebildung an der Austreibung von Kohlensäure aus Bicarbonat gemessen. Unten ist die Phosphoglycerinsäurebildung allein mit Zusatz von Wasser bzw. von Adenylsäure dargestellt (I u. II), die praktisch Null ist und auf der oberen Kurve III in Gegenwart einer gleichen Menge Cozymase. In Fig. 3 ist dasselbe für die Dismutation von Hexosediphosphat zu Phosphoglycerinsäure und Glycerinphosphorsäure in Gegenwart von Fluorid gezeigt. Auch dies geht, wie man sieht, praktisch nicht mit Adenylsäure (I), sondern nur mit Cozymase (II)

vonstatten. Damit ist die schon von verschiedenen Seiten geäußerte Vorstellung experimentell bewiesen, daß die Cozymase zwei getrennte Funktionen hat: a) die Umesterung von Phosphat, die im wesentlichen identisch ist mit der, die durch das freie Adenylsäuresystem bewirkt wird, und b) die Oxydoreduktion, die an eine spezifische Gruppe der Cozymase geknüpft ist, die jetzt als Nicotinsäureamid erkannt worden ist.

Fig. 3. Dismutation von Hexosediphosphat (bzw. Triosephosphat) in Phosphoglycerinsäure und  $\alpha$ -Glycerinphosphorsäure.

0 ohne Coferment, I mit Adenylsäure, II mit Cozymase, a Hexosediphosphat allein, b Hexosediphosphat + Glukose.



Bei der Milchsäurebildung, auf die ich hier nicht näher eingehen kann, liegen diese Verhältnisse ähnlich, aber offenbar nicht gleich. Die Funktion des freien Adenylsäuresystems ist beide Male dieselbe, und die Umesterungsreaktionen sind identisch. Die Oxydoreduktion bei der Milchsäurebildung spielt sich zur Hauptsache zwischen Brenztraubensäure und Triosephosphorsäure ab und führt zu Milchsäure und Phosphoglycerinsäure. Diese Oxydoreduktion bedarf nun scheinbar viel weniger Cozymase als die analoge Reaktion der Gärung zwischen Triosephosphorsäure und Acetaldehyd. Infolgedessen ist im dialysierten Muskel-extrakt das freie Adenylsäuresystem als Coferment der Milchsäurebildung hinreichend. Ich möchte es aber für wahrscheinlich halten, daß hier Spuren von Cozymase oder einer ähnlich wirkenden Substanz im dialysierten Rückstand des milchsäurebildenden Ferments zurückgeblieben sind, vielleicht in einer schwer dissoziierbaren Form. Das muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

#### Literatur:

Hauptsächlich im Vortrag benutzte Arbeiten: O. MEYERHOF u. K. LOHMANN, *Biochem. Z.* 271, 89 (1934). — O. MEYERHOF u. W. KIESSLING, *Biochem. Z.* 281, 249; 283, 83 (1935). — O. MEYERHOF, K. LOHMANN u. PH. SCHUSTER, *Biochem. Z.* 286, 301, 319 (1936). — O. MEYERHOF, *Helvet. chim. Acta* 18, 1030 (1935). — P. OHLMEYER, *Biochem. Z.* 1936 (im Druck). — O. MEYERHOF u. W. KIESSLING, *Naturwiss.* 24, 361 (1936).