

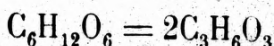
# Beteiligung der Reduktase im Prozesse der Alkoholgärung.

Von  
**W. Palladin.**

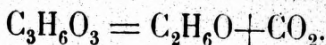
(Pflanzenphysiologisches Institut der Universität St. Petersburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. April 1908.)

Die hervorragenden Untersuchungen E. Buchners und dessen Mitarbeiter<sup>1)</sup> zeigen, daß Alkoholgärung mit der lebenden Zelle nicht untrennbar verknüpft ist; dieser Prozeß wird vielmehr durch ein spezifisches Enzym, Zymase, hervorgerufen. Späterhin kamen E. Buchner und ebenso Stoklasa<sup>2)</sup> zu dem Schlusse, daß Glukose nicht unmittelbar zu Alkohol und Kohlensäure verarbeitet, sondern zunächst in zwei Moleküle Milchsäure gespalten wird:



Milchsäure wird alsdann zu Alkohol und  $\text{CO}_2$  zerspalten.



Obschon ich obige Voraussetzung nicht für endgültig nachgewiesen halte, denn Milchsäure könnte auch als Spaltungsprodukt der Eiweißstoffe auftreten,<sup>3)</sup> schließe ich mich dennoch der Meinung der genannten Forscher in der Beziehung vollkommen an, daß aus Glukose nicht unmittelbar Alkohol und Kohlensäure entstehen.

Ich vermute ebenfalls, daß am Spaltungsprozesse des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure mehrere Enzyme teilnehmen. Es muß vor allem darauf hingewiesen werden, daß die Reindarstellung der Zymase bis jetzt nicht gelungen ist. Sowohl im Hefepreßsaft als im Zymin und ebenfalls in den aus verschiedenen Pflanzensäften erhältlichen Alkoholniederschlägen finden

<sup>1)</sup> E. Buchner, H. Buchner u. M. Hahn, Zymasegärung, 1903.

<sup>2)</sup> Stoklasa, Diese Zeitschrift, Bd. L, S. 303, 1907.

<sup>3)</sup> Katsuji Inouye u. Kondo, Diese Zeitschr., Bd. LIV, S. 481, 1908.

sich neben der hypothetischen Zymase noch mehrere andere Enzyme vor, deren Beteiligung am Gärungsprozesse nur in dem Falle geaugnet werden könnte, wenn wir bereits über rein dargestellte Zymase verfügten. Es ist wohl bekannt, daß sowohl Hefepreßsaft als Acetondauerhefe beträchtliche Mengen der Reduktase und der Katalase enthalten. In meiner früher publizierten Abhandlung<sup>1)</sup> war ich auf Grund verschiedener theoretischer Erwägungen zu dem Schluß gekommen, daß die beiden genannten Enzyme vorwiegend unter anaëroben Verhältnissen tätig sind. Durch die Untersuchungen von Größ<sup>2)</sup> wird die Ansicht bestätigt, daß Alkoholgärung nicht durch Zymase allein bedingt wird. Der genannte Forscher hat gefunden, daß auch Hydrogenase am Prozesse der Alkoholgärung regelmäßig teilnimmt. Die vorliegende Arbeit hat den Zweck, darzutun, daß die Reduktase, eines der verbreitetsten Enzyme der Pflanzen und der Tiere, am Prozeß der Alkoholgärung unmittelbar beteiligt ist. In den Versuchen verwendete ich sowohl gewöhnliches als auch glykogenarmes<sup>3)</sup> Zymin (durch Aceton abgetötete Hefe). Als Reagenzien auf Reduktase benutzte ich selenigsäures Natrium<sup>4)</sup> und Methylenblau. Da die enzymatische Natur der Reduktase zuweilen noch bezweifelt wird, so habe ich zunächst folgenden Vorversuch ausgeführt. Es wurden zwei Portionen gewöhnlichen Zymins zu je 4 g abgewogen. Die eine Portion wurde mit 100 ccm 2,5%iger Wasserlösung des selenigsäuren Natriums und ein paar Tropfen Toluol übergossen. Nach 24 Stunden hat sich eine beträchtliche Menge des reinen Selens als roter Niederschlag abgesetzt. Die andere Portion wurde mit 50 ccm destilliertem Wasser gekocht und nach dem Erkalten mit 50 ccm

<sup>1)</sup> W. Palladin, Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 207, 1908.

<sup>2)</sup> Größ, Untersuchungen über die Atmung und Atmungsenzyme der Hefe. Zeitschr. f. ges. Brauwesen, Bd. XXVII, 1904; Über den Nachweis mittels der Chromogramm methode, daß die Hydrogenase aktiv bei der Alkoholgärung beteiligt ist. Ber. d. Deutsch. botan. Ges., S. 191, 1908.

<sup>3)</sup> Buchner und Mitscherlich, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 554, 1904.

<sup>4)</sup> Scheurlen, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XXXIII, S. 135, 1900; Klett, ebenda, S. 137.

5%iger Wasserlösung des selenigsauren Natriums und ein paar Tropfen Toluol versetzt. An dieser Portion wurden im Verlauf von mehreren Tagen gar keine Veränderungen wahrgenommen. Das Zymin blieb vollkommen weiß und es hat sich keine Spur des roten Niederschlags gebildet. Durch diesen Versuch wird die enzymatische Natur der Hefereduktase außer jeden Zweifel gestellt. Beide Portionen wurden mit etwas Chloroform versetzt, dann verschlossen und dienen jetzt als Dauerpräparate auf Vorlesungen behufs Demonstration der enzymatischen Tätigkeit der Reduktase.

In anderen Versuchen wurden gleiche Mengen des Zymins mit gleichen Mengen einer Wasserlösung des selenigsauren Natriums übergossen. Diejenigen Portionen, denen nichts mehr beigegeben wurde, färbten sich nach 24 Stunden rot infolge Abscheidung des metallischen Selens. Andere Portionen wurden mit Glukose versetzt. Je mehr Glukose zugesetzt worden war, desto unbedeutender war die Menge des nach Ablauf von 24 Stunden abgeschiedenen metallischen Selens; bei Zusatz von beträchtlichen Glukosemengen fand keine Abscheidung des Selens nach 24 Stunden statt: erst viel später erschien ein roter Niederschlag. Durch Zuckergabe wird also die Reduktion des Selens verlangsamt und eventuell auch vollkommen beseitigt. Daraus ist der Schluß zu ziehen, daß Reduktase im Spaltungsprozeß der Glukose auf Alkohol und Kohlensäure unmittelbar beteiligt ist und daher das selenigsaure Natrium unberührt läßt.

Behufs Lösung der Frage, ob die hemmende Wirkung der Glukose tatsächlich auf Alkoholgärung zurückzuführen ist, habe ich in einer anderen Versuchsserie Wasserlösungen des selenigsauren Natriums mit gleichen Mengen Zymin und mit verschiedenen nicht vergärbaren organischen Stoffen versetzt: es wurden nämlich Glycerin, Lactose und Mannit verwendet. Die genannten Substanzen übten keine hemmende Wirkung; es wurden vielmehr in Gegenwart des Milchzuckers und des Mannits allem Anschein nach größere Mengen des metallischen Selens abgeschieden als in destilliertem Wasser und zwar hatte dann der Niederschlag eine hochrote Färbung, die im letzteren Falle (in Wasserlösungen) nicht wahrzunehmen war.

Die Abscheidung des metallischen Selens wird aber durch Zusatz von vergärbaren Stoffen gehemmt. Außer der Glukose habe ich von den genannten Stoffen Saccharose und Galaktose verwendet. Die hemmende Wirkung der beiden letztgenannten Stoffe war schwächer als diejenige der Glukose. Am schwächsten war die Wirkung der Galaktose.

In einigen Versuchen wurde Methylenblau als Reagens auf Reduktase benutzt. Sowohl Hefepreßsaft<sup>1)</sup> als Zymin reduzieren und entfärben Methylenblau bei Sauerstoffabschluß. In meinen Versuchen wurden 0,05%ige Wasserlösungen von Methylenblau in Erlenmeyersche Kolben hineingetan, mit Zymin versetzt und oben mit einer Schicht Olivenöl übergossen behufs Isolierung vom Sauerstoff der Luft. Am folgenden Tage waren die Lösungen bereits farblos. Bei Anwendung derselben Mengen des Zymins und des Farbstoffs unter Glukosezusatz war eine bedeutend langsamere Entfärbung zu verzeichnen. Während Wasserlösungen bereits entfärbt worden waren, blieben Glukoselösungen noch gefärbt.

Obige Versuche zeigen also, daß Reduktase im Prozeß der Alkoholgärung als selbständiges Enzym beteiligt ist; es sind also keine Gründe vorhanden zu der Annahme, daß Zymase reduzierende Eigenschaften hat, wie dies Hahn<sup>2)</sup> voraussetzt. Diese Annahme ist um so weniger berechtigt, als die Bezeichnung «Zymase» von E. Buchner in letzter Zeit nur als Sammelbegriff gehandhabt wird, der die Gesamtheit der bei der Alkoholgärung mitwirkenden Enzyme zusammenfassen soll.

Die beschriebenen Versuche bieten auch Anhaltspunkte dar zur Lösung der Frage der von Pfeffer<sup>3)</sup> festgestellten Elektionsfähigkeit der Pflanzen hinsichtlich verschiedener Nährstoffe. Wird eine Lösung von zwei ungleichen Nährwert besitzenden organischen Verbindungen den Schimmelpilzen zur Verfügung gestellt, so absorbieren letztere, wie Pfeffer zeigte, fast aus-

---

<sup>1)</sup> E. Buchner, H. Buchner u. M. Hahn, Zymasegärung, 1903, S. 341.

<sup>2)</sup> E. Buchner, Zymasegärung, S. 348.

<sup>3)</sup> Pfeffer, Über Elektion organischer Nährstoffe (Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik, Bd. XXVIII, 1895, S. 205).

schließlich die bessere Nährsubstanz, die andere Substanz unberührt lassend. So wird z. B. aus einer Lösung von Glukose und Glycerin nur erstere von den Schimmelpilzen absorbiert; erst bei unzureichendem Glukosegehalt gehen Schimmelpilze zur Glycerinabsorption über. Bedeutend früher hat schon Pasteur<sup>1)</sup> dargetan, daß einige Bakterien und ebenfalls *Penicillium glaucum* die  $d + l$ -Weinsäure in der Weise spalten, daß sie nur  $d$ -Weinsäure absorbieren,  $l$ -Weinsäure aber unberührt lassen. Dieselbe Elektionsfähigkeit beobachten wir bei der Acetondauerhefe; von den beiden Nährstoffen — Glukose und selenigsaurem Natrium bezw. Methylenblau — wird nur Glukose gespalten, die Nährsubstanz von geringerem Werte bleibt dagegen unberührt. Bei Abwesenheit der Glukose werden jedoch selenigsaures Natrium und Methylenblau von der abgetöteten Hefe zersetzt.

Gegenwärtig verfügen wir über die von E. Buchner und dessen Mitarbeiter erfundene Abtötungsmethode der Hefe durch Aceton, wobei die in der Hefe vorhandenen Enzyme ihre Wirksamkeit nicht verlieren; dadurch wurde ein Weg gebahnt für die Untersuchungen über die Stoffumwandlungen nicht nur lebender, sondern auch abgetöteter Organismen. Auf Samenpflanzen läßt sich mit besserem Erfolg die von mir ausgearbeitete<sup>2)</sup> Abtötungsmethode mittels Erfrieren anwenden. Bei dieser Methode wird eine Zerkleinerung der Objekte vermieden, die eine beträchtliche Abnahme der Tätigkeit der Enzyme zur Folge hat. Die in meinem Laboratorium ausgeführten Untersuchungen von Fräulein Gromow und Grigoriew<sup>3)</sup> zeigten, daß bei der Acetondauerhefe nicht nur ein mit Eiweißzerfall verknüpfter Hungerzustand, sondern auch Ernährung mit verschiedenen organischen Stoffen zu verzeichnen ist.

Zum Schluß will ich einige der ausgeführten Versuche mitteilen, die als Muster aller übrigen dienen können.

#### Versuch 1.

Sechs kleine Erlenmeyersche Kolben wurden mit je 50 ccm 5%iger Lösung des selenigsauren Natriums beschickt.

<sup>1)</sup> Pasteur, Comptes rendus, Bd. XLVI, S. 617, 1858.

<sup>2)</sup> Palladin, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 407, 1906.

<sup>3)</sup> Grigoriew u. Gromow, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 299, 1904.

Der erste Kolben wurde alsdann mit 10 g Glukose, der zweite mit 20 g Glukose, der dritte mit 10 g Glycerin, der vierte mit 10 g Milchzucker, der fünfte mit 5 g Mannit versetzt. Der sechste Kolben wurde mit keinem organischen Stoffe versetzt. Außerdem wurde allen sechs Kolben je 4 g gewöhnliches Zymin beigegeben. Nach Ablauf von 24 Stunden war in dem mit 20 g Glukose beschickten Kolben kein roter Niederschlag vorhanden; der mit 10 g Glukose versetzte Kolben enthielt eine unbedeutende Menge des metallischen Selens; alle übrigen Kolben wiesen dagegen große Mengen des roten Selens auf. Nach längerem Stehenlassen bildete sich allmählich in den mit Glukose versetzten Kolben ein roter Selenniederschlag; nach Ablauf von 10 Tagen war derselbe bereits in großer Menge vorhanden und hatte eine hochrote Färbung, die sich von der orangeroten Färbung des in Wasserlösung abgeschiedenen Niederschlages scharf unterschied.

### Versuch 2.

Sechs kleine Erlenmeyersche Kolben wurden mit je 100 ccm 2,5%iger Lösung des selenigsauren Natriums beschickt. Dem ersten Kolben wurde nichts mehr beigegeben, der zweite wurde mit 30 g Glukose, der dritte mit 30 g Saccharose, der vierte mit 30 g Galaktose, der fünfte mit 5 g Milchsäure und mit 25 g Ammoniumlaktat versetzt. Außerdem wurden alle fünf Kolben mit je 4 g gewöhnlichem Zymin beschickt. Nach 24 Stunden wurde in dem mit Wasserlösung versetzten Kolben eine große Menge des roten Niederschlages wahrgenommen, während in dem mit Glukose versetzten Kolben eine äußerst geringe, in dem mit Saccharose versetzten eine etwas größere, in dem mit Galaktose versetzten eine noch größere, aber immerhin noch bedeutend geringere Menge des Niederschlages als auf der Wasserlösung zu verzeichnen war. Nach Ablauf von 10 Tagen erschien in allen mit Zuckerlösungen versetzten Kolben ein roter Niederschlag in großer Menge. Eine besonders intensive rote Färbung des Niederschlages war in dem mit Saccharose versetzten Kolben zu verzeichnen. In dem mit Milchsäure versetzten Kolben bildete sich auch nach 15 tägigem Stehen gar kein Nieder-

schlag. Es blieb dahingestellt, ob hier die Milchsäure dieselbe Wirkung wie Glukose ausübte, oder ob sie sich als ein Gift erwies.

### Versuch 3.

Sechs Erlenmeyersche Kolben mit sehr großer Bodenfläche wurden mit je 200 g 2%iger Lösung des selenigsauren Natriums beschickt. Zwei Kolben erhielten keinen weiteren Zusatz, zwei andere Kolben wurden mit je 100 g Glukose versetzt, der fünfte Kolben wurde mit 100 g Saccharose, der sechste mit 100 g Milchzucker versetzt. Zwei Kolben (der eine mit Wasser und der andere mit Glukoselösung) wurden außerdem mit je 4 g glykogenarmem Zymin, vier übrige Kolben wurden mit je 4 g gewöhnlichem Zymin beschickt. Die Reduktion war in diesem Versuche infolge größerer Flüssigkeitsmenge eine langsamere.

a) Gewöhnliches Zymin. Nach 2 Tagen bedeutender Selenniederschlag in Wasser und in Milchzuckerlösung; gar kein Niederschlag in Glukoselösung. In Saccharoselösung ist der Niederschlag bedeutend geringer als in Wasser. Nach 5 Tagen hat sich in Wasser- und in der Milchzuckerlösung ein reichlicher Niederschlag gebildet. In Saccharoselösung hat sich ebenfalls ein roter Niederschlag gebildet, der allerdings geringer war als derjenige der Wasserlösung. In der Glukoselösung wurden nur Spuren des roten Niederschlags wahrgenommen.

b) Glykogenarmes Zymin. Nach 2 Tagen wurde ein kaum merkbarer Niederschlag in Wasser, gar kein Niederschlag in Glukoselösung wahrgenommen. Nach 5 Tagen war der Niederschlag der Wasserportion bedeutend geringer als derjenige der Kontrollportion des gewöhnlichen Zymins. In Glukoselösung war auch nach 5 Tagen kein Niederschlag zu verzeichnen.

### Versuch 4.

Vier Erlenmeyersche Kolben mit großer Bodenfläche wurden mit je 100 ccm 4%iger Lösung des selenigsauren Natriums versetzt; zwei Kolben erhielten außerdem einen Zusatz von je 50 g Glukose. Dann wurden zwei Kolben (der eine mit Wasser und der andere mit Glukoselösung) mit je 4 g gewöhnlichem Zymin, die beiden übrigen Kolben mit je 4 g glykogen-

armem Zymin beschickt. Es ergab sich in Übereinstimmung mit dem Resultate des vorstehenden Versuches, daß glykogenarmes Zymin eine später auftretende und langsamere Reduktion bewirkt als gewöhnliches Zymin.<sup>1)</sup>

### Versuch 5.

Zwei Erlenmeyersche Kolben mit großer Bodenfläche wurden mit je 200 ccm 0,05%iger Wasserlösung von Methylenblau versetzt; der eine Kolben wurde außerdem mit 100 g Glukose beschickt. Dann wurde in die beiden Kolben je 4 g gewöhnliches Zymin hineingetan und schließlich eine große Schicht Olivenöl eingegossen. Nach 2 Tagen wurde die Wasserlösung von Methylenblau entfärbt, die Glukoselösung von Methylenblau blieb dagegen im Verlauf von einigen Tagen hochgefärbt. Bei Beginn des Versuches wurden beide Kolben mit ein paar Tropfen Chloroform versetzt; in den vorhergehenden Versuchen mit selenigsaurem Natrium wurde immer Toluol hinzugefügt.

---

<sup>1)</sup> Beide Zyminpräparate wurden gleichzeitig von Anton Schroder, München, Landwehrstr. 45, bezogen, doch nicht auf Gärfähigkeit geprüft.