

Beitrag zur Kenntnis der glykolytischen Prozesse.
(Vorläufige Mitteilung.)

Von

Dr. Gerson G. Wilenko, z. Zt. Festungs-Spital Döblin.

(Der Redaktion zugegangen am 4. Dezember 1916.)

Die kürzlichst erschienene Publikation von Euler und Tholin,¹⁾ die mir jetzt zu Gesicht gekommen ist, veranlaßt mich auch über meine, obwohl noch nicht abgeschlossenen Versuche, die dasselbe Gebiet berühren, eine kurze Mitteilung zu machen.

Im Jahre 1914 haben Rona und ich²⁾ Versuche veröffentlicht, die den Einfluß der H⁺-Ionenkonzentration auf die Glykolyse im Menschen- und Kaninchenblute zeigen. Eine H⁺-Ionenkonzentration von 2—3. 10⁻⁷ schwächt schon die Glykolyse und 4—6. 10⁻⁷ hebt sie auf.

Im Anschluß an diese Untersuchungen habe ich dann auch andere glykolytische Fermente (Hefe, Kefir) einer diesbezüglichen Prüfung unterzogen. Die nächstfolgenden Ereignisse zwangen mich, die Versuche abubrechen, und erst seit kurzer Zeit bin ich wieder in der Lage, meine Untersuchungen — wenn auch unter bescheidenen Bedingungen — langsam fortzusetzen. (Die hier mitgeteilten Versuche sind im hiesigen, für übliche klinische Untersuchungen eingerichteten und von mir geleiteten Laboratorium ausgeführt worden. Dem Herrn Sanit.-Chef Oberstabsarzt Dr. L. Hoffmann möchte ich für wohlwollendes Interesse und dem Spitalskommandanten Herrn Oberarzt Dr. B. Popper für freundliches Entgegenkommen auch an dieser Stelle meinen besten Dank aussprechen.)

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 97, H. 6, S. 269.

²⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 62, H. 1 u. 2.

Die Ergebnisse der bisherigen Versuche mit Kefir erlauben noch keinerlei Urteil, daher sollen nur die Untersuchungen über den Einfluß der H⁺-Ionenkonzentration auf die Glykolyse durch Hefe den Gegenstand dieser Mitteilung bilden.

Die verwendete Methodik bei dieser Untersuchung war wie folgt: Käufliche Bäckerhefe oder Tropenhefe¹⁾ wurde mit der vierfachen Menge destillierten Wassers² sorgfältig zu einer gleichmäßigen Suspension verrieben und davon mittels Pipette Probierröhrchen mit in den Tabellen angegebenen Mengen beschickt; dann wurden zu jedem Röhrchen soviel Kubikzentimeter destillierten Wassers hinzugefügt, wieviel noch notwendig war, um das Flüssigkeitsvolumen nach den noch zu erwähnenden Zusätzen auf 20 Kubikzentimeter zu bringen. Zum Schluß kam die zur Herstellung der gewünschten H⁺-Ionenkonzentration verwendete Lösung und die angegebene Menge von Glykoselösung. Die Röhrchen werden jetzt durchgeschüttelt, die Reaktion mit Lackmuspapier bestimmt und in Eichhornsche Gärungsröhrchen ohne Stöpsel umgegossen. Nach 20—24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird die entwickelte Gasmenge abgelesen, die Reaktion auf Lackmuspapier festgestellt und eine Probe der Flüssigkeit auf Reduktionsvermögen mittels Alkali und Kupfersulfatlösung untersucht. Die Röhrchen, die kein Gas entwickelten, wurden oft auf Körper, die Jodoformreaktion geben, mittels Alkali und Jodjodkali untersucht.

Wegen der Möglichkeit, daß die alkalische Gärungsflüssigkeit entwickeltes CO₂-Gas gebunden enthalten könnte, werden die offenen Schenkel der Gärungsröhrchen bis zur Hefeschicht abpipettiert, reichlich mit Phosphorsäure (bis zur Bläuung von Kongopapier, nach dem weiter angegebenen Durchschütteln) versetzt, mit destilliertem Wasser bis zum Rande genau gefüllt und unter Daumenverschluß gut durchgeschüttelt. Die eventuell in Freiheit gesetzte Gasmenge wird wie gewöhnlich abgelesen. Kontrollen mit gekochter Hefe, mit Zucker + Phosphat ohne Hefe, und mit Phosphat + Hefe ohne Zucker sind bei der Mehrzahl der Versuche ausgeführt worden.

¹⁾ Hefedauerpräparat der Firma Rudolf Adler, Wien 34.

Die geschilderte Methodik erhebt keinen Anspruch auf quantitative Genauigkeit. Ich behalte es mit für spätere Versuche vor. Bei den Versuchen, die nach obiger Methode ausgeführt wurden, sind zur Herstellung einer bestimmten H⁺-Ionenkonzentration $n/3$ -Lösungen von sekundärem oder Gemische von $n/3$ -sekundärem und $n/3$ -primärem Natriumphosphat verwendet worden.

Als Beispiel solcher Versuche sei nachstehende Tabelle I angeführt.

Wir können aus dieser Tabelle mehrere Schlußfolgerungen ziehen.

Wir sehen, daß es — durch Zusatz eines alkalischen Gemisches von sekundärem und primärem oder des rein sekundären Natriumphosphates zur Gärungsflüssigkeit — gelingt, die CO₂-Entwicklung vollständig zu unterdrücken. Dabei ist die Gärung oder, besser gesagt, die Glykolyse nicht geschädigt, denn der Zucker ist aus der Lösung verschwunden (keine Reduktion) und es sind Substanzen aufgetreten, die die Jodoformreduktion geben und sauer reagieren.

Wir sehen weiter, daß der zum Zustandekommen dieser Erscheinung nötige Phosphatzusatz sich in bestimmten Grenzen bewegt. Ein Mehr schädigt die Hefefermente und die Flüssigkeit zeigt wieder Reduktionsfähigkeit (Vers. 1.); ein Weniger an den alkalischen Phosphaten hat zur Folge, daß die CO₂-Entwicklung nicht vollständig gehemmt wird. Diese Tatsachen liefern den Beweis, daß das Verschwinden des Zuckers aus der Lösung nicht etwa auf Kondensation des Zuckermoleküls beruht. Es wäre doch schwer zu erklären, warum eine schwach alkalische Reaktion das Zuckermolekül unversehrt läßt und eine noch etwas geringere OH⁻-Ionenkonzentration dieses Molekül kondensiert. Ebenso ist auch das Auftreten von Substanzen, die die Jodoformreaktion geben, zu deuten, und in gleichem Sinne ist die Säuerung der alkalischen Gärungsflüssigkeit zu verwerthen.

Die Wichtigkeit des Alkalitätsgrades des Phosphatgemisches muß besonders betont werden: 4 ccm eines Gemisches von $n/3$ -primärem und -sekundärem Natriumphosphat im Ver-

Tabelle I.

Nr. des Versuches	Nr. des Röhrchens	Hefesuspension in ccm	dest. Wasser in ccm	1/3 n-Natriumphosphat in ccm		zugesezte Glukose-lösung ccm- und %-Gehalt	Reaktion der Gärungsflüssigkeit	Nach 20—24 Stunden			Bemerkungen	
				primär	sekundär			Reaktion	entwickelte gasförmige CO ₂ in % des vergorenen Zuckers	Menge von CO ₂ nach Zusatz von H ₃ PO ₄		Reduktion
Nr. 1	1	2		1	15	2 ccm 10%	alkalisch	alkalisch	0	0	++	Bäckerhefe bei 3 Jodoformreaktion +
	2	2	8	0,5	7,5	2 ccm 10%	alkalisch	schwach alk.	0	0	+	
	3	2	12	0,25	3,75	2 ccm 10%	alkalisch	sauer	0	0	0	
	4	2	14	0,12	1,88	2 ccm 10%	alkalisch	sauer	0,43	0,53	0	
	5	2	16			2 ccm 10%	sauer	sauer	0,87		0	
Nr. 2	1	2	12		4,0	2 ccm 10%	alkalisch	sauer	0	0	+	Bäckerhefe bei 3 Jodoformreaktion +
	2	2	12	0,1	3,9	2 ccm 10%	alkalisch	sauer	0	0	0	
	3	2	12	0,25	3,75	2 ccm 10%	alkalisch	sauer	0	0	0	
	4	2	12	2,7	1,3	2 ccm 10%	alkalisch	sauer	0,25	0,5	0	
	5	2	16			2 ccm 10%	sauer	sauer				
Nr. 3	1	2	14		3	1 ccm 20%	alkalisch	sauer	0	0	0	Tropenhefe
	2	2	13	2	2	1 ccm 20%	schwach alk.	sauer	0,35	0,5	0	
	3	2	17			1 ccm 20%	sauer	sauer	0,5			
Nr. 4	1	2	13		4	1 ccm 20%	alkalisch	sauer	0	0		Tropenhefe
	2	2	13	0,5	3,5	1 ccm 20%	alkalisch	sauer	Spur	0,1		
	3	2	13	2	2	1 ccm 20%	schwach alk.	sauer	0,3	0,5		
	4	2	17			1 ccm 20%	sauer	sauer	0,5			

Tabelle I. (Fortsetzung).

Nr. des Versuches	Nr. des Röhrchens	Hefesuspension in ccm	dest. Wasser in ccm	1/3 n-Natriumphosphat in ccm		zugesezte Glukoselösung ccm- und %-Gehalt	Reaktion der Gärungsflüssigkeit	Nach 20—24 Stunden			Bemerkungen	
				primär	sekundär			Reaktion	entwickelte gasförmige CO ₂ in % des vergorenen Zuckers	Menge von CO ₂ nach Zusatz von H ₃ PO ₄		Reduktion
Nr. 5	1	2	13		4	1 ccm 20%	alkalisch	sauer	0	0	0	Tropenhefe
	2	2	12		4	2 ccm 20%	alkalisch	sauer	0,75	0,9	0	
	3	2	17			1 ccm 20%	sauer	sauer	0,63			
Nr. 6	1	3	11		4	2 ccm 20%	alkalisch	sauer	0,9	über 1%	0	Tropenhefe bei 4 Jodoformreaktion +
	2	2	12		4	2 ccm 20%	alkalisch	sauer	0,5	0,8	+	
	3	3	12		4	1 ccm 20%	alkalisch	sauer	0	0	0	
	4	2	13		4	1 ccm 20%	alkalisch	sauer	0	0	0	
	5	2	13	0,25	3,75	1 ccm 20%	alkalisch	sauer	0	0	0	
	6	2	13	0,5	3,5	1 ccm 20%	alkalisch	sauer	0,1	0,15	0	
	7	2	13	1,3	2,7	1 ccm 20%	schwach alk.	sauer	0,3	0,4	0	
	8	2	17		1	1 ccm 20%	sauer	sauer	0,75			
Nr. 7	1	2		1	15	2 ccm 20%	alkalisch	Spur sauer	0	0	0	Bäckerhefe
	2	2	11	0,3	4,7	2 ccm 20%	alkalisch	sauer	1,0	1,1	0	

hältnis 1 : 16 unterdrückt völlig die CO_2 -Entwicklung in 20 ccm 1%iger Zuckerlösung, die 0,75 g Hefe enthält; während ein Phosphatgemisch im Verhältnis 1 : 8 unter denselben Bedingungen es nicht mehr tut und noch weniger Gemische von geringerem OH^- -Ionengehalt.

Die Menge des passend alkalischen Phosphatgemisches hängt von der Menge des vorhandenen Zuckers ab (Vers. 5, 6 und 7). Je mehr Zucker, desto mehr ist vom alkalischen Phosphatgemische notwendig, um die Glykolyse ohne Kohlensäure zu ermöglichen. Geringeren Einfluß hat diesbezüglich die verwendete Quantität von Hefe (Vers. 6).

Diese Erscheinungen scheinen darauf hinzudeuten, daß der Angriffspunkt der OH^- -Ionen zur Änderung des Verlaufes der Hefeglykolyse sich am Zuckermoleküle befindet.

Dafür spricht auch der Umstand, daß Hefe aus Versuchen mit vollständigem Unterdrücken der CO_2 -Entwicklung sich noch als gärungsfähig mit CO_2 -Produktion erwiesen hat, wenn man sie nach Abzentrifugieren der ursprünglichen Flüssigkeit mit frischer Glukoselösung zusammengebracht hat.

Zahlenangaben über die OH^- - resp. H^+ -Ionenkonzentration der Gärungsflüssigkeit, bei welcher die CO_2 -Produktion unterbleibt, kann ich vorläufig keine machen, da für Messungen der elektromotorischen Kraft die Apparatur fehlte und die Verwendung von Indikatoren nach Sørensen an der Trübung der Gärungsflüssigkeit scheiterte. Auch hätten die Zahlen nur relativen Wert, denn, wie hervorgehoben, ist der wirksame Phosphatzusatz von der Zuckermenge abhängig und sicher hat auch die sauer reagierende Hefesuspension einen gewissen Einfluß.

Zur ersten Orientierung mögen die in der Tabelle I enthaltenen Angaben verwertet werden.

Aus den bisherigen Ausführungen geht deutlich hervor, daß für die kohlenstofffreie Glykolyse durch Hefe in erster Linie der Alkalitätsgrad des Phosphatzusatzes wichtig ist, doch war nicht von der Hand zu weisen, daß dabei auch dem Phosphation als solchem eine wesentliche Bedeutung zukommt.

Um diese Frage zu entscheiden, habe ich versucht, durch andere Substanzen, ohne Phosphate, der Gärungsflüssigkeit den

zur Hemmung der CO_2 -Produktion nötigen Gehalt an OH^- -Ionen zu erteilen. Viele Versuche scheiterten entweder am schädlichen Einfluß der Puffersubstanzen auf die Hefe oder an dem Umstande, daß die Regulationsbreite der Puffer zu gering war und die entstehenden sauren Produkte der Glykolyse die alkalische Reaktion der Gärungsflüssigkeit zu bald in eine saure verwandelt haben.

Doch ist es möglich, auch ohne Phosphate eine kohlenstofffreie Glykolyse durch Hefe zu erzielen, und zwar mit Hilfe von Natronlauge (wahrscheinlich wirken die Na-Salze der sauren Glykolyseprodukte als Regulatoren). Als zweckmäßig hat sich folgendes Verfahren erwiesen. Die Hefeemulsion wird durch tropfenweisen Zusatz von $n\text{-NaOH}$ deutlich alkalisch gemacht und in die einzelnen Röhrchen verteilt. Durch Hinzufügen von destilliertem Wasser und Zuckerlösung wird die Gärungsflüssigkeit auf 1% Zuckergehalt und ein Volumen von 20 ccm gebracht. Die Reaktion wird durch eventuellen neuerlichen Zusatz von $n\text{-NaOH}$ wieder deutlich alkalisch gemacht (Lackmuspapier) und jetzt noch 0,6 ccm $n\text{-NaOH}$ zugesetzt. Als Kontrolle wurden parallele Proben mit 1. gekochter Hefe, 2. ohne Hefe, 3. ohne Zucker angesetzt.

Wir sehen aus der folgenden Tabelle, daß die Unterdrückung der CO_2 -Entwicklung bei Glykolyse durch Hefe auch ohne Anwesenheit von Phosphaten experimentell möglich ist. Der Einfluß der Zuckermenge tritt hier ebenso deutlich hervor wie bei den Phosphatversuchen und auch sonst sind beide Verfahren übereinstimmend. Es ist die Schlußfolgerung berechtigt, daß die kohlenstofffreie Glykolyse vermittelt Hefe nur durch die OH^- -Ionen bewirkt wird.

Ob den Phosphationen nicht ein etwa beschleunigender Einfluß auf den Prozeß beizumessen wäre, können die bisherigen Versuche nicht entscheiden. Sicher ist, daß die experimentelle Arbeit mit Verwendung von Phosphaten als Regulatoren der Reaktion viel bequemer und weniger zeitraubend sich gestaltet.

Tabelle II.

Nr. des Versuches	Nr. des Röhrchens	Hefesuspension in ccm	dest. Wasser in ccm	ccm und %-Gehalt der zugesetzten Glukose-lösung	ccm zuge-setzter n-NaOH	Reaktion der Gärungs-flüssigkeit	nach 20—24 Stunden				Bemerkungen
							Reaktion	ent-wickelte Gas-förmige CO ₂ in % des ver-forenen Zuckers	Menge von CO ₂ nach Zu-satz von H ₂ PO ₄	Reduk-tion	
Nr. 1	1	3	16	1 ccm 20%	0,6	alkalisch	schwach sauer	0	0	0	Versuch mit 4 ccm sekundärem Phosphat verhält sich wie Röhrchen I
	2	3	11	1 ccm 20%		sauer	sauer	0,9			
Nr. 2	1	3	16	1 ccm 20%	0,6	alkalisch	schwach sauer	0	0	0	Phosphat-Versuch wie oben
	2	3	11	1 ccm 20%		sauer	sauer	0,9			
Nr. 3	1	3	16	1 ccm 20%	0,6	alkalisch	schwach sauer	0	0	Spuren	Phosphat-Versuch wie oben
	2	3	15	2 ccm 20%	0,6	alkalisch	sauer	0,72		+	
	3	3	16	1 ccm 20%		sauer	sauer	1,0			

Tropenhefe

Die hier angeführten Versuche zeigen, daß ein bestimmter Gehalt der Gärungsflüssigkeit an OH^- -Ionen den Verlauf der Hefeglykolyse qualitativ verändern kann. Diese Tatsache ist auch für die menschliche Physiologie von Interesse. Im Blute des Menschen verläuft die Glykolyse mit minimaler, zu dem verschwundenen Zucker in gar keinem Verhältnis stehender, CO_2 -Produktion. Diese Erscheinung ist jetzt nicht ohne Analogie.

Über den Mechanismus der kohlenstofffreien Gärung geben die bisherigen Untersuchungen keine Anhaltspunkte. Allerdings ist bemerkenswert, daß der passende OH^- -Ionengehalt von der Zuckermenge abhängig ist und daß die Hefe nach beendeter kohlenstofffreier Gärung ihre Eigenschaft, Kohlensäure aus Zuckerlösungen zu entwickeln, nicht eingebüßt hat. Folgende Vorstellung ist möglich: der gewöhnliche Gang der Hefeglykolyse wird durch harmonische Tätigkeit mehrerer aufeinander eingestellter Fermente und Abbauprodukte bewirkt. Ein bestimmter Gehalt an OH^- -Ionen verändert eine nicht näher bekannte Abbaustufe derart, daß sie von dem ihr korrespondierenden Fermente nicht weiter abgebaut werden kann.

Ergebnisse.

Die Zuckergärung durch Hefe wird bei einem bestimmten Alkalitätsgrad und Regulatorengehalt der Gärungsflüssigkeit qualitativ verändert. Es entsteht keine Kohlensäure.

Die Bedeutung des Phosphations bei diesem Prozesse ist noch nicht sicher festgestellt. Unentbehrlich ist es nicht.

Der Angriffspunkt der OH^- -Ionen bildet wahrscheinlich eine Abbaustufe des Zuckermoleküls.