



Title	Beiträge zur Atmungsphysiologie von einer Kahlhefe, <i>Hansenula anomala</i>
Author(s)	USAMI, Shoichiro
Citation	Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University. Ser. 5, Botany, 5(2), 77-108
Issue Date	1942
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26263
Type	departmental bulletin paper
File Information	5(2)_P77-108.pdf



Beiträge zur Atmungsphysiologie von einer Kahmhefe, *Hansenula anomala*

Von

SHOICHIRO USAMI

Inhaltsverzeichnis

	SEITE
Einleitung	78
Experimentelles:	
A. Versuche mit intakten Zellen	79
I. Atmung bei Zugabe von verschiedenen Atmungssubstraten.	81
II. Atmung bei Zugabe von Alkoholen:	
1. Verschiedene Alkohole	83
2. Konzentration des Alkohols	85
3. pH des Atmungsmediums	86
4. Maximale O ₂ -Aufnahme im Gegenwart bestimmter Menge des Äthylalkohols	87
5. Einfluss des Semicarbazids auf die Äthylalkohol- oxydation	88
6. Maximale O ₂ -Aufnahme im Gegenwart bestimmter Menge von Acetaldehyd bzw. von Essigsäure.....	89
III. KCN-Hemmung der Atmung	90
B. Versuche mit extrahierten Dehydrasepräparaten:	
I. Methodisches	91
II. Beteiligung der Dehydrasekomponenten an <i>Hansenula</i> - Dehydrase (Bedürfnis des Coferments usw.).....	95
III. Verschiedene Donatoren	97
IV. Verschiedene Alkohole	98
V. Alkoholdehydrase:	
1. Abhängigkeit der Donatorkonzentration	100
2. pH-Abhängigkeit	101
3. Einfluss von Semicarbazid	102
4. Einfluss von Monojodessigsäure	103
Schlussbetrachtungen	104
Zusammenfassung	106

Einleitung

Hansenula anomala (*Willia anomala* oder *Saccharomyces anomalus*) gehört zu einer Kahlhefe, welche neben dem Vermögen zur alkoholischen Gärung noch die Wirksamkeit für lebhaftere aerobe Atmung besitzt. Die Stoffwechselphysiologie dieser Hefe wurde früher z.B. von EHRLICH¹⁾ hinsichtlich ihrer Essigsäuregärung, von SCHANDERL²⁾ hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Stickstofffixierung und ferner von TANIDA³⁾ und von TERUI⁴⁾ hinsichtlich ihrer Nitratreduktion studiert. Vom praktischen Standpunkt aus ist *Hansenula anomala* in der Gärungsindustrie des japanischen Reisweins als ein Geruchs- und Geschmackserreger verwendet worden. Ihre biochemische Verhalten beim Vorgang der Nachgärung und ihre praktische Bedeutung im Sakégewinnungsverfahren sind schon von mehreren Forschern⁵⁾ berichtet worden. Trotzdem liegen in der Literatur keine Arbeiten vor, welche sich mit dem übrigen Abbaustoffwechsel, der Atmung genannter Hefe beschäftigen. Ich habe einige atmungsphysiologischen Untersuchungen dieser Hefe gemacht und in der vorliegenden Mitteilung werden die Resultate meiner Versuche berichtet. Erstens habe ich die Atmungsintensität der betreffenden Hefe im Gegenwart verschiedener Atmungssubstrate gemessen und dabei gefunden, dass der Äthylalkohol unter den gesuchten Substanzen für die Hefe das beste Atmungssubstrat bildet. Atmungsintensität durch Angebot von Äthylalkohol überwog bei weitem diejenige im Gegenwart von Glucose bzw. Milchsäure. Dieses spezifische Verhalten gegen Äthylalkohol charakterisiert diese Kahlhefe von anderen Kulturhefen wie Bierhefe.

Die besonders gute Verwertung des Äthylalkohols als Atmungssubstrat dieser Hefe ist verständlich, da die Hefe, wie schon bemerkt, in der japanischer Weinindustrie als ein Nachgärer verwendet wird und deshalb an das Medium des Alkohols in höherer Konzentration gewohnt ist. Es kann angenommen werden, dass Äthylalkohol und

- 1) F. EHRLICH: Biochem. Ztschr., **36** (1911), 477; Ber. d. deutsch. chem. Ges., **44** (1911), 3737.
- 2) H. SCHANDERL: Zbt. f. Bakt. Abt. II., **101** (1940), 401.
- 3) K. TANIDA: Jōzōgaku-Zasshi (Japanisch), **13** (1935), 981.
- 4) G. TERUI: Ebenda, **14** (1936), 703.
- 5) Z. B. T. TAKAHASHI und H. SATO: Bull. Imp. Univ. Coll. of Agricul. Tokyo, **1** (1911), 227; T. TAKAHASHI und T. YAMAMOTO: Ebenda, **1** (1911), 275.

andere Gärungsprodukte, die im japanischen Reiswein durch die Wirkung von *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces Saké* usw. vorgebildet worden sind, durch diese Hefe angegriffen und in Geruchs- und Geschmacksmittel des Reisweins umgesetzt werden. Ich habe demgemäss unter anderen mich mit einigen näheren Untersuchungen über die Oxydation des Alkohols durch diese Hefe beschäftigt.

Im zweiten Abschnitt dieser Mitteilung wird über die Dehydraseaktivität der betreffenden Hefe berichtet. Ich habe das Acetonpräparat von *Hansenula*-Hefe hergestellt und die Aktivität der aus Aceton-Hefe präparierten Dehydrase zur Methylenblau-reduktion *in vitro* unter Zusatz verschiedener Dehydrasekomponenten wie Codehydrase, Diaphorase anderer Herkunft untersucht. Dabei fand ich auch, dass die Alkoholdehydrase unter anderen Dehydrasen in der Acetonhefe am stärksten wirkt. Die Natur und Wirkungsart dieser Dehydrase wurden etwas eingehend untersucht.

Experimentelles

A. VERSUCHE MIT INTAKTEN ZELLEN.

Die Organismen wurden auf festem HENNEBERG-Nährboden kultiviert. Die Zusammensetzung dieses Nährmediums war wie folgt:

Saccharose	150 g
Pepton	5 g
Kaliumbiphosphat	5 g
Magnesiumsulfat	2 g
Natriumcarbonat	5 g
Agar-agar	18 g
Aqua dest.	1000 ccm

Auf diesem Nährboden wurde die Hefe etwa 40 Stunden lang bei 30°C gezüchtet. Da das Wachstum der *Hansenula anomala* auf diesem Nährboden sehr üppig ist, genügt für manometrische Atmungsversuche die gesammelte Hefemasse von Strichkulturen in 5-7 Reagensröhren von 3 cm Durchmesser. Die mit dem Spatel gesammelte Hefeernte wurde durch Zentrifugierung und danachfolgende Aufschwemmung im destillierten Wasser dreimal gewaschen und schliesslich im destillierten Wasser suspendiert.

Das Cytochromsystem dieser Hefe war, spektroskopisch untersucht, ganz identisch mit demjenigen der gewöhnlichen Kulturhefe, und man kann drei Absorptionsbänder des Cytochroms a,b und c im Spektrum leicht beobachten.

Aber diese nur auf der Zentrifuge gewaschenen Hefesuspensionen sind für die Atmungsversuche ungeeignet, da die auf diesem zuckerreichen Nährmedium gewachsenen Hefen sehr reich an den zelleigenen Atmungssubstraten sind. Durch Verwendung des Verarmungsverfahrens an Gehaltstoffen nach SMEDLEY MACLEAN¹⁾ und WIELAND²⁾ gelang es mir, diese Eigensubstrate von den Hefezellen möglichst zu beseitigen. Zu diesem Zweck erfuhr die Hefesuspension kräftige langdauernde (etwa 10 Stunden) Schüttelung oder Durchleitung der Luft bei 30°. Die verarmte Hefe wurde für Konstanthaltung der physiologischen Eigenschaften im Eisschranck bei 0° aufbewahrt. In diesem Zustand war die Hefesuspension während etwa einer Woche nur mit geringerer allmählichen Erniederung der Eigenatmung haltbar.

Die Atmung, d.i. die Sauerstoffaufnahme, wurde mittels der BARCROFTschen Manometerapparatur im Thermostat von 30° gemessen. Das Reaktionsmilieu in den Atmungsgefäßen wurde folgendermassen zusammengesetzt:

1 ccm Hefesuspension (Trockengewicht: 5-10 mg)	} im Hauptraum,
0,5 ccm Phosphatpufferlösung (M/2, pH 7,2)	
0,5 ccm Destilliertes Wasser	
0,5 ccm Substratlösung (M/6)	in der Ansatzbirne,
0,5 ccm KalilaugeLösung (10%)	im Einsatz.

Der Gasraum des Gefäßes wurde mit Luft gefüllt. Nach 10-minütiger Schüttelung des Manometers zur Einnstellung der Temperatur wurde die Substratlösung von der Ansatzbirne in den Hauptraum des Atmungsgefäßes gekippt, und von da an wurden die Manometerausschläge mit je 10-minütigem Intervall abgelesen. Die Messungen der Atmung dauerten im allgemeinen 60 Minuten.

-
- 1) I. SMEDLEY MACLEAN und D. HOFFERT: Biochem. Journ., **20** (1926), 343.
 - 2) H. WIELAND und O. B. CLAREN: LIEBIGS Ann. Chem., **492** (1932), 185.

I. Atmung bei Zugabe von verschiedenen Atmungssubstraten.

Zuerst wurden die Einflüsse von den für die Atmung der Mikroorganismen oft in Betracht kommenden Atmungssubstraten auf die Sauerstoffaufnahme von *Hansenula anomala* untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle I zusammengestellt. In der Tabelle bedeutet Q_{O_2} die aufgenommene Sauerstoffmenge in ccm in 60 Minuten pro 1 mg Hefetrockensubstanz. Daneben sind auch die „Verhältnisse“ der Atmung — relative Menge des aufgenommenen Sauerstoffs — von verschiedenen Substraten zur Eigenatmung, d.h. die Atmung ohne Substratzusatz, in Prozenten ausgedrückt.

Wie in dieser Tabelle ersichtlich, erweist Äthylalkohol unter den gesuchten Substratarten für *Hansenula anomala* sich als das beste Atmungssubstrat. Durch Zusatz von M/30 Äthylalkohol steigt die Atmung der während 10 Stunden verarmten Hefe auf etwa Fünffaches der Eigenatmung. Längere Verarmungsdauer verursacht weitere Erniedrigung der Eigenatmung und folglich höheres Beschleunigungsverhältnis. Man kann die 7–10-malige gesteigerte Atmung leicht beobachten. Glucose, Milchsäure, Brenztraubensäure, Essigsäure und Acetaldehyd werden von der Hefe schlechter ausgenutzt als Äthylalkohol: die Beschleunigungsverhältnisse betragen Dreibis Vierfaches der Eigenatmung. Bernsteinsäure wird noch schlechter gebraucht, und durch Zusatz von dieser Säure wird praktisch keine Steigerung der Atmung der *Hansenula*-Hefe beobachtet. Es ist schon von WIELAND und SONDERHOFF¹⁾ berichtet worden, dass die Bernsteinsäure durch verarmte Bierhefe mit nur sehr langsamer Geschwindigkeit oxydiert. Aber LYNEN und NECIULLAH²⁾ behaupten, dass die geringere Ausnutzung der Bernsteinsäure durch verarmte Hefe ihre Ursache in der geringen Durchlässigkeit der intakten Hefepiasmamembran hat. Und sie bestätigten diese Annahme durch Versuche, welche ergaben, dass die Oxydation der Bernsteinsäure durch Auftauen der Hefezellen unter Anwendung von flüssiger Luft aufs Mehrfache gesteigert wurde. Aminosäuren werden durch *Hansenula*-Hefe nicht so schnell oxydiert.

1) H. WIELAND und R. SONDERHOFF: LIEBIGs Ann. Chem., **499** (1932), 213

2) F. LYNEN und N. NECIULLAH: Ebenda, **541** (1939), 203.

Tabelle I.

Atmung von *Hansenula anomala* bei Zugabe verschiedener
Atmungssubstrate.

Hefetrockensubstanz: 5-10 mg
30°
pH 7,2 Phosphatpuffer M/10
Substrat: M/30
Versuchsdauer: 1 Stunde.

Substrat	Q _{o₂}	Verhältnis
Ohne Substratzusatz	10,1	100
Äthylalkohol	50,2	497
Glucose	34,2	339
Saccharose	29,9	296
Ameisensäure	13,3	132
Essigsäure	30,1	298
Bernsteinsäure	10,5	104
Milchsäure	36,7	363
Brenztraubensäure	41,2	408
Äpfelsäure	10,4	110
Citronensäure	10,5	110
Acetaldehyd	30,0	297
Glykokoll	15,2	150
Alanin	15,5	153
Leucin	12,2	121
Glutaminsäure	19,7	195

Die hervorragende Schnelligkeit, womit *Hansenula anomala* Äthylalkohol oxydiert, ist ein Merkmal dieser Hefe. Zum Vergleich wurde die Atmung anderer Kulturhefen versucht. Z.B. bei Bierhefe, wie man in folgender Tabelle II bemerkt, ist die Oxydationsgeschwindigkeit des Äthylalkohols im Vergleich mit derjenigen der Glucose nicht bedeutend verschieden, sogar um wenigens geringer. In der vor kurzem veröffentlichten Mitteilung von YAMAGUTCHI¹⁾ ist es auch bemerkbar, dass Glucose bei Bäcker- sowie Bierhefe besseres Atmungssubstrat als Äthylalkohol darstellt. In Bezug auf diese besonders grosse Affinität gegen Äthylalkohol ist *Hansenula anomala* den Essigbakterien ähnlich. Allerdings bleibt die absolute Gesch-

1) S. YAMAGUTCHI: Acta Phytochim., 12 (1941), 115.

Tabelle II.

Atmung von Bierhefe.

Bierhefe von SAPPORO-BIER-FABRICK
 Hefetrockensubstanz: ca. 10 mg
 Verarmungsdauer: etwa 10 Stunden
 Versuchsbedingungen wie bei *Hansenula*.

Substrat	Q _{o₂}	Verhältnis
Ohne Substratzusatz	2,8	100
Äthylalkohol	12,4	436
Glucose	13,3	468
Alanin	3,6	127

windigkeit der Alkoholoxydation bei *Hansenula* beträchtlich hinter der bei Essigbakterien.

II. Atmung bei Zugabe von Alkoholen.

Nachdem ich in den vorhergehenden Untersuchungen die auffallend grosse Aktivität der *Hansenula*-Hefe gegen Äthylalkohol festgestellt hatte, habe ich dann über die Atmung bei Zugabe des Alkohols etwas eingehende Versuche angestellt.

1. Verschiedene Alkohole.

Zuerst wurden die verschiedenen Alkohole auf ihr Verhalten gegenüber der Atmung von *Hansenula anomala* geprüft. Die Resultate dieser vergleichenden Untersuchungen sind in der Tabelle III zusammengestellt. In der Tabelle sind die Ausnutzungsgrade verschiedener Alkohole im Vergleich mit dem des Äthylalkohol ausgedrückt. Die Zahlen in der Tabelle bedeuten die verhältnismässige Oxydationsstärke—aufgenommene Sauerstoffmenge, dabei wird der Wert für Äthylalkohol gleich 100 gesetzt. Die Konzentration der zugegebenen Alkohole war im Allgemeinen M/30.

Alle geprüften Alkohole, mit Ausnahme von Allylalkohol, werden mehr oder weniger ausgenutzt. Allerdings zeigt Äthylalkohol die grösste Reaktionsgeschwindigkeit. Was nun die Oxydationsgeschwindigkeit anderer Alkohole anbelangt, so ist zunächst bei einwertigen Alkoholen in der Tabelle bemerkbar, dass die Alkohole mit

Tabelle III.

Atmung von *Hansenula anomala* bei Zugabe
verschiedener Alkohole.

Versuchsbedingungen wie in der Tabelle I.
Alkoholkonzentration: M/30.

Alkohole	Verhältnis
Ohne Substratzusatz	15,0
Methylalkohol	17,8
Äthylalkohol	100,0 ($Q_{O_2}=50,2$)
<i>n</i> -Propylalkohol	56,0
<i>iso</i> -Propylalkohol	47,9
<i>n</i> -Butylalkohol	44,2
<i>iso</i> -Butylalkohol	39,5
<i>iso</i> -Amylalkohol	25,8
Allylalkohol	9,7
Äthylenglykol	32,9
Glycerin	69,8
Mannit	37,4
Dulcit	20,0
Inosit	19,3

weniger C-Atomzahl, ausgenommen Methylalkohol, immer schneller oxydiert werden, d.i. die Oxydationsstärke von *Hansenula* mit zunehmender C-Atomzahl herabsinkt, und ferner die *normal*-Verbindungen im Vergleich mit den *iso*-Verbindungen immer schneller oxydiert werden. Diese stufenartigen Verminderung der Atmungssteigerungswirkung verschiedener einwertiger Alkohole mit zunehmender C-Zahl und die Minderwertigkeit der *iso*-Verbindungen als Atmungssubstrat sind mit den Erscheinungen bei anderen Organismen, z.B. Essigbakterien nach den Angaben von TANAKA¹⁾, ganz identisch. Methylalkohol wird nur in ganz unbedeutender Geschwindigkeit oxydiert. In M/30-Konzentration übt Methylalkohol auf die Atmung von verarmter *Hansenula*-Hefe weder Steigerung noch Hemmung aus. Die Oxydationsgeschwindigkeit des Methylalkohols ist auch bei Essigbakterien beträchtlich klein¹⁾. Ungesättigter Alkohol, Allylalkohol in M/30 gewissermassen hemmt die *Hansenula*-Atmung. Glycerin wird ziemlich schnell angegriffen. Seine Wirkung der Atmungs-

1) K. TANAKA: J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B. Div. 2, 3 (1938), 121.

aktivierung ist unter den anderen Alkoholen mit Ausnahme von Äthylalkohol am stärksten. Die Affinität des zweiwertigen Alkohols, Glykols zur Hefe ist eine geringere als die des dreiwertigen Alkohols, Glycerins. Unter den sechswertigen Alkoholen wird Mannit mit der Hefe verhältnismässig schnell oxydiert.

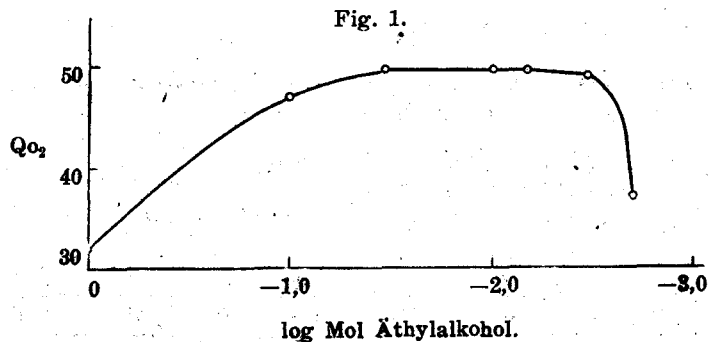
2. Konzentration des Alkohols.

Zweitens wurde die Abhängigkeit der *Hansenula*-Atmung von der Konzentration des zugesetzten Äthyl- und Propylalkohols untersucht. Die Versuche führten zum Ergebnis, dass die intakten Zellen der betreffenden Hefe schon in M/300 Äthylalkohol gesättigt sind (Tabelle IV und Fig. 1). Sie haben ein sehr breites Optimum der Äthylalkoholkonzentration, und die Konzentrationen zwischen M/30 und M/300 haben praktisch dieselbe Aktivierung gegenüber der Atmung zur Folge. Bei Propylalkohol liegen die Verhältnisse etwas

Tabelle IV.

Substratkonzentrationsabhängigkeit der Äthylalkohol-Atmung.

Äthylalkohol	Q _{O₂}
1M	32,1
M/10	47,0
M/30	49,8
M/100	49,7
M/150	49,7
M/300	49,2
M/500	37,1



anders. Optimale Konzentration liegt bei beinahe M/100, und die Oxydationen verlaufen bei konzentriertem bzw. bei verdünntem Propylalkohol langsamer (siehe Tabelle V).

Tabelle V.

Substratkonzentrationsabhängigkeit der Propylalkohol-Atmung.

Propylalkohol	Qo ₂
M/10	24,3
M/30	27,4
M/100	33,2
M/300	30,3
M/500	24,5

3. pH des Atmungsmediums.

Unter Verwendung von M/10 Phosphatpuffer wurde die pH-Abhängigkeit der Atmung von intakten *Hansenula*-Zellen im Bereich von pH 6,0 bis pH 8,0 geprüft. Das pH-Optimum liegt bei 7, wenn Äthylalkohol als Atmungssubstrat dient. Die pH-Abhängigkeitskurve sinkt von dem neutralen Punkt nach beiden Seiten allmählich ab. Wie die weiter unter erwähnten Untersuchungen ergeben werden (siehe hierzu Tabelle XVIII und auch XIX), verschiebt sich das Wirkungsoptimum von zellfreien Extrakten für Alkoholdehydrierung nach der schwach alkalischen Seite. Da das pH-Optimum der intakten Zellen wahrscheinlich von verschiedenen physiologischen Faktoren abhängt, wird es nicht nur durch das pH-Optimum der Alkoholdehydrase unbedingt bestimmt.

Tabelle VI.

Verhältnismässige Sauerstoffaufnahme bei verschiedenen pH von intakten *Hansenula*-Zellen.

Äthylalkohol (M/30) als Substrat.

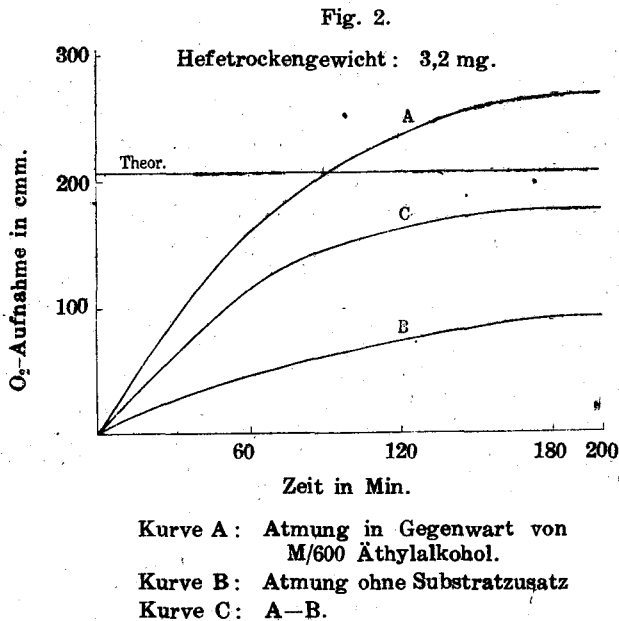
Phosphatpuffer in M/10.

Der Wert für pH 7,0 ist gleich 100 gesetzt.

pH	6,0	6,8	7,0	7,2	7,6	8,0
Verhältnis	94,4	98,4	100	96,0	81,8	78,3

4. Maximale O₂-Aufnahme im Gegenwart bestimmter Menge des Äthylalkohols.

Versuche über die vollständige Oxydation des Äthylalkohols durch intakte Zellen der *Hansenula anomala* wurden manometrisch ausgeführt. Von dem Zeitpunkt aus, an dem äusserst verdünnter Äthylalkohol aus der Ansatzbirne in den Hauptraum des Manometertrogs eingekippt wurde, wurden die Druckänderungen des Manometers so lange gemessen, bis die Sauerstoffaufnahme beinahe vollständig zum Stillstand kam. Ein typisches Beispiel dabei erhaltener Ergebnisse wird in Fig. 2 angegeben.



Kurve C in Fig. 2 bedeutet die gerechnete wahre Oxydationskurve des Äthylalkohols selbst. Wenn man annimmt, dass Äthylalkohol durch *Hansenula*-Hefe in Essigsäure oxydiert, so soll für 1 Mol Äthylalkohol 1 Mol Sauerstoff aufgenommen werden. Theoretischer Wert der für Oxydation des untersuchten M/600 Äthylalkohols erforderlichen Sauerstoffmenge ist 207 cmm bei 30°. Beobachteter Wert, d.i. die Summe der während 200 Minuten aufgenommenen Sauerstoffmenge war 176,7 ccm. Daraus folgt, dass die Organismen für 1 Mol Äthylalkohol etwa 0,87 Mol Sauerstoff auf-

nehmen. Durch diese manometrischen Versuche lässt sich ohne weiteres schliessen, dass Äthylalkohol durch *Hansenula anomala* wenigstens bis auf die Stufe der Essigsäure oxydiert wird. In Übereinstimmung mit diesem Befund steht die schon früher angeführte chemisch-analytische Untersuchung von EHRlich¹⁾, dass Essigsäure in Kulturen von *Willia anomala* auf Äthylalkohol nachgewiesen wurde. Während aber genannte Hefe eine Fähigkeit besitzt, die Essigsäure oxydierend anzugreifen, wie man in der Tabelle I erkennen kann, muss die gebildete Essigsäure weiter oxydiert werden.

5. Einfluss des Semicarbazids auf die Äthylalkoholoxydation.

Bei der Oxydation des Äthylalkohols ist aller Wahrscheinlichkeit nach zu erwarten, dass der Acetaldehyd als Zwischenprodukt auftritt, da er doch zweifellos das erste Dehydrierungsprodukt des Alkohols darstellt. Wenn dieses bei *Hansenula anomala* der Fall ist, so kann man erwarten, dass die Dehydrierung des Äthylalkohols unter Anwendung des Fixierungsmittels des Aldehyds auf der Stufe des Acetaldehyds sistiert wird. Ich habe versucht, mit Hilfe des Semicarbazids den als Zwischenprodukt zu entstehen angenommenen Acetaldehyd zu blockieren und folglich dessen weitere Oxydation zu schädigen. Die Sauerstoffaufnahme bei Angebot des Äthylalkohols wurde in der Tat mittels des Semicarbazids erniedrigt. Der scheinbare Hemmungsgrad der Sauerstoffaufnahme während 1 Stunde nach dem Zeitpunkt des Semicarbazidzusatzes in verschiedenener Konzentration ist in der Tabelle VII angegeben.

Tabelle VII.

Einfluss des Semicarbazids auf Äthylalkohol-Atmung.

Versuchsdauer: 1 Stunde.

Äthylalkohol: M/30.

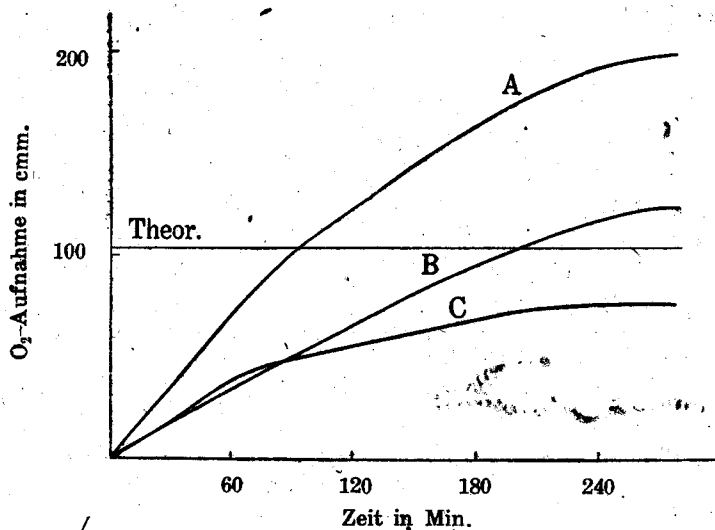
Semicarbazidhydrochlorid.

Semicarbazidkonz.	Hemmung in %
M/5	37,8
M/10	31,3
M/200	14,0
M/1000	14,9

1) F. EHRlich: Biochem. Ztschr., **36** (1911), 477; Ber. d. deutsch. chem. Ges., **44** (1911), 3737.

Bestimmung der maximal aufgenommenen Sauerstoffmenge durch langdauernde Versuche im Gegenwart bestimmter Menge von Äthylalkohol und mit zugefügtem Semicarbazid zeigt, dass die *Hansenula*-Zelle gegen 1 Mol Alkohol etwa 0,37 Mol Sauerstoff aufnimmt (siehe Fig. 3). Theoretisch soll 0,5 Mol Sauerstoff pro 1 Mol Alkohol aufgenommen werden, wenn man annimmt, dass Äthyl-

Fig. 3.
Hefetrockengewicht: 3,3 mg.



Kurve A: Atmung in Gegenwart von
M/600 Äthylalkohol und
M/200 Semicarbazid.
Kurve B: Atmung ohne Substratzusatz.
Kurve C: A-B.

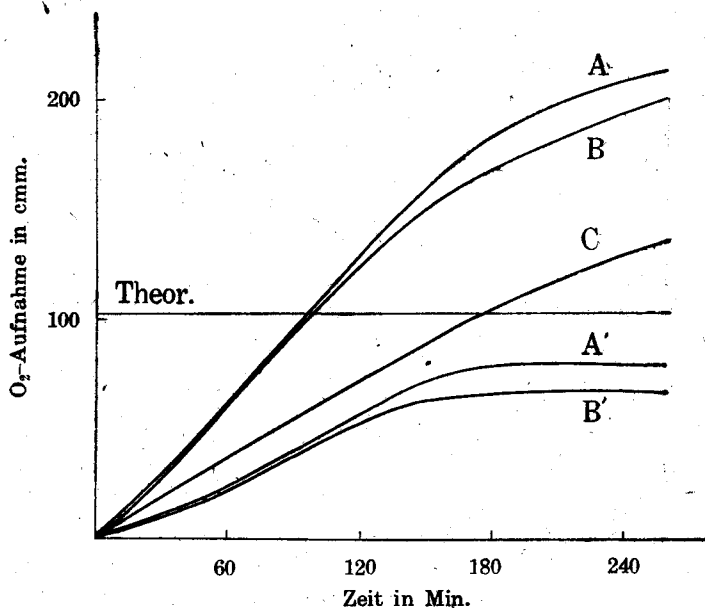
alkohol in Acetaldehyd umgesetzt wird. Da im Vergleich dieses Werts mit der schon beschriebenen maximalen Sauerstoffaufnahme in Abwesenheit des Semicarbazids, diese ungefähr 2-mal grösser als jener ist, kann man schliessen, dass Äthylalkohol durch *Hansenula*-Zelle über Acetaldehyd in Essigsäure oxydiert wird.

6. Maximale O₂-Aufnahme im Gegenwart bestimmter Menge von Acetaldehyd bzw. Essigsäure.

Versuche über die vollständige Oxydation des Acetaldehyds bzw. der Essigsäure durch *Hansenula anomala* zeigte, dass für je 1 Mol eines dieser Substrate etwa 0,3-0,4 Mol Sauerstoff aufgenommen

wurde (Fig. 4). Es ist zweifellos, dass die Hefe Acetaldehyd in Essigsäure oxydiert. Andererseits ist es schon längst nach WIELAND und SONDERHOFF¹⁾ angenommen, dass ein Produkt der Essigsäureoxydation durch Hefe die Bernsteinsäure ist. Sie behaupten, dass

Fig. 4.
Hefetrockengewicht : 3,5 mg.



- Kurve A : Atmung in Gegenwart von
M/600 Essigsäure.
Kurve B : Atmung in Gegenwart von
M/600 Acetaldehyd.
Kurve C : Atmung ohne Substratzusatz.
Kurve A' : A-C.
Kurve B' : B-C.

Bernsteinsäure aus 2 Molekeln Essigsäure durch Dehydrierung entsteht. Falls dies so ist, soll für 1 Mol Essigsäure je 0,5 Mol Sauerstoff erforderlich sein.

III. KCN-Hemmung der Atmung.

Es ist wohl bekannt, dass bei den biologischen Oxydationen verschiedener Substrate *in vivo* die Häminkatalyse beteiligt ist, die im Vorgang der Zellatmung neben der Dehydrase eine wichtige Rolle spielt. Wie beschrieben, habe ich in der Suspension der *Hansenula*

1) H. WIELAND und R. SONDERHOFF: LIEBIGS Ann. Chem., **499** (1932), 213.

Zellen deutliche Cytochromspektren beobachtet. Ich habe mich daneben mit der KCN-Hemmung der *Hansenula*-Atmung beschäftigt, da das Kaliumcyanid als ein typischer Inhibitor der Hämkatalyse auf die aerobe Atmung verschiedener Organismen schädlich zu wirken anerkannt ist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle VIII zusammengestellt. Die Oxydation des Propyl- und Butylalkohols wurde durch KCN in verhältnismässig geringem Masse gehemmt.

Tabelle VIII.

KCN-Hemmung der Atmung in Gegenwart
Verschiedener Atmungssubstrate.

KCN M/1000
pH 7,2
Substrat: M/30.

Substrat	Hemmung in %
Ohne Substratzusatz	11,5
Äthylalkohol	65,0
Propylalkohol	27,3
Butylalkohol	26,0
Glycerin	59,4
Acetaldehyd	45,4
Essigsäure	45,9
Milchsäure	60,0
Glucose	44,6

B. VERSUCHE MIT EXTRAHIERTEN DEHYDRASEPRÄPARATEN.

I. Methodisches.

Zum Studium der Dehydraseaktivität mit THUNBERG-Rohr waren die intakten Zellen von *Hansenula anomala*, ob sie auch während längerer Zeiten die Verarmung erfahren hatten, nicht geeignet, weil sie bei Zugabe verschiedener Wasserstoffdonatoren keine deutliche Verkürzung der Entfärbungszeit des Methylenblaus gegenüber den Kontrollversuchen hervorriefen; eine Entfärbung des Methylenblaus trat in Abwesenheit von zugefügten Donatoren verhältnismässig schnell ein. Wie in der nachstehenden Tabelle IX ersichtlich, wirkten Äthylalkohol, Glucose bzw. Milchsäure auf die Methylenblau-reduktion nur in sehr geringem Masse aktivierend. Alle Methylenblauversuche wurden gewöhnlicherweise nach der THUNBERG'schen Technik im Thermostat bei 30° ausgeführt. Nach

Evakuierung des Rohrs wurde der Inhalt vom Retortenansatz in den Hauptraum eingekippt und die zur vollständigen Entfärbung des Methylenblaus erforderliche Zeit gemessen.

Um die Zusatzeffekte von Wasserstoffdonatoren klarer zu machen und folglich um die Dehydrasewirkung näher zu untersuchen,

Tabelle IX.

Methylenblaureduktion der intakten *Hansenula*-Zellen.

Verarmung der Hefe: ca. 10 Stde.

Jeder Thunberg-Ruhr enthielt 1 ccm Hefesuspension (5,2 mg Trockensubstanz), 1 ccm M/6 Substrat, 0,5 ccm M/2 Phosphatpuffer pH=7,2 1 ccm dest. Wasser und 0,5 ccm M/4000 Methylenblau. Gesamtvolumen: 4 ccm. T=30°.

Substrat	Mb-Entfärbungszeit in Min.
Ohne Zusatz	16
Äthylalkohol	10
Glucose	12
Milchsäure	12

habe ich mich mit den zellfreien Extrakten aus diesen Mikroorganismen beschäftigt. Zu diesem Zweck habe ich die Aceton-Trockenpräparate von *Hansenula anomala* dargestellt.

Die Herstellung der Acetonpräparate der betreffenden Hefe gelang mir im allgemeinen auf folgende Weise: Die gesammelte Hefemasse aus Massenkulturen, die auf Agarnährböden in grösseren Schalen geschahen wurde auf der Zentrifuge mit destilliertem Wasser dreimal gewaschen, während mehrerer Stunden verarmt, nochmals gewaschen und schliesslich in kleines Volum des dest. Wassers suspendiert. Die erhaltene konzentrierte Suspension wurde eisgekühlt und dann allmählich in etwa 7-8-faches Volum von eisgekühltem Aceton unter konstantem Umrühren eintropfen gelassen. Um das Enzym vor Inaktivierung zu schützen, soll die Temperatur während der Behandlung mit Aceton niedrig gehalten werden. Der aufgefallene Niederschlag wurde dann abgesaugt, mit kaltem Aceton und schliesslich mit kaltem Äther gewaschen und im Vakuumexsikator unter vermindertem Druck getrocknet.

0,5 g des pulverisierten *Hansenula*-Trockenpräparates wurden in 5 ccm oder 10 ccm M/10 Phosphatlösung pH 7,6 während 2 Stunden bei 30° extrahiert. Auf der Zentrifuge wurde die etwas opaleszente

leicht gelbe Lösung von dem Niederschlag getrennt. Die durch Zentrifugierung erhaltene überstehende Lösung wurde in ihrer dehydrierenden Wirkung mit dem Bodensatz verglichen, welcher in ursprüngliches Volum der Phosphatlösung suspendiert wurde.

Wie in folgenden Tabellen gezeigt wird, besitzt die Lösung stärkere Dehydraseaktivität als das Sediment. Man kann erkennen, dass die wirksame Dehydrase, wenigstens die Alkohol- und Milchsäuredehydrase, in die Lösung übergeht, jedoch nicht in allen Quantitäten.

Tabelle X.

Vergleichung der überstehenden Flüssigkeit und des Sedimentes in ihrer Dehydraseaktivität. Milchsäure als H-Donator.

1 ccm	Suspension, überstehende Flüssigkeit oder Sediment in ursprüngliches Volum der Phosphatlösung.
1 ccm	M/6 Milchsäure,
0,5 ccm	M/2 Phosphatpuffer pH 6,8,
0,1 ccm	M/8000 Methylenblau,
1 ccm	Aqua Dest.

	Mb-Entfärbungszeit in Min.	
	Ohne Donator	Milchsäure
Suspension*	32	8
Überstehende Flüssigkeit	33	14
Sediment	>60	40

* Ursprüngliche Suspension vor Zentrifugierung.

Tabelle XI.

Vergleichung der überstehenden Flüssigkeit und des Sedimentes in ihrer Dehydraseaktivität. Äthylalkohol als H-Donator.

0,4 ccm	Überstehende Flüssigkeit oder Sediment in ursprüngliches Volum der Phosphatlösung,
0,2 ccm	M/2 Äthylalkohol,
0,2 ccm	Cozymase,*
0,1 ccm	M/2 Phosphatpuffer pH 7,6,
0,1 ccm	M/2000 Methylenblau.

	Mb-Entfärbungszeit in Min.		
	Äthylalkohol	Ohne Donator	Äthylalkohol ohne Cozymase
Überst. Flüssigk.	2	11	6
Sediment	4	21	23

* Siehe folgende Seite.

Aber wie in den Tabellen ersichtlich, ist diese Enzymlösung imstande, Methylenblau ohne Zusatz von Wasserstoffdonator zu entfärben, d. i. sie enthält noch eine bedeutende Menge der Wasserstoffdonatoren. Um diese beigemengten Donatorsubstanzen zu beseitigen, habe ich die Enzymlösung dialysiert. Dialyse der Enzymlösung geschah unter Verwendung von Fischblase gegen fließendes Leitungswasser während etwa 6 Stunden. Die Temperatur des Leitungswassers von diesem Laboratorium betrug glücklicherweise ein ganzes Jahr hindurch unter 15° . Durch Dialyse wurden mit den Substratmolekülen auch gleichzeitig dialysierbaren Dehydrasekomponenten, welche bei der Wirkung vieler Dehydrasen notwendig sind, von dem Enzympräparat befreit. Ich habe diese an der Dehydrasewirkung als beteiligt anerkannten Komponenten, die Codehydrase und die Diaphorase, aus Bäckerhefe¹⁾ dargestellt und bei den Versuchen dem Enzym zugesetzt. Die Codehydrase wurde nach der Vorschrift von Euler²⁾ präpariert und bis auf die Stufe der Cu-Fällung gereinigt³⁾. Die Diaphorase („coenzyme factor“) wurde auch nach EULER⁴⁾ durch zweimalige Ammonsulfatfällung aus dem alkalischen Hefeautolysat dargestellt.

- 1) Von "TÖA"-HEFE-FABRIK hergestellte Hefekuchen wurden benutzt.
- 2) H. v. EULER, H. ALBERS und F. SCHLENK: Ztschr. f. physiol. Chem., **240** (1936), 113.
- 3) Das Codehydrasepräparat auf dieser Reinigungsstufe enthält wahrscheinlich neben der Cozymase (Diphosphopyridinnucleotid) noch die Codehydrase II (Triphosphopyridinnucleotid). Aber es ist wohl bekannt, dass die Alkoholdehydrasen verschiedener Herkunft in ihrer Wirksamkeit unter beiden Codehydrasen nur die Cozymase benötigen (siehe hierzu z. B. E. NEGELEIN und H. J. WULFF, Biochem. Ztschr. **293** (1937) 351; E. ADLER und M. SREENIVASAYA, Ztschr. f. physiol. Chem. **249** (1937) 24; T. H. QUIBELL, Ebenda **251** (1938) 102 usw.), und deshalb habe ich das Codehydrasepräparat in diesem Zustand als Cozymase verwendet.
- 4) H. v. EULER, H. HELLSTRÖM und G. GÜNTHER: Ztschr. f. physiol. Chem., **258** (1939), 47. Um die Wirkungsstärke aller Präparate möglichst konstant zu behalten, wurden die Mengenverhältnisse vom dabei verwandten Ausgangsmaterial und Reagens nach EULERScher Vorschrift wie folgt festgestellt: 50 g Hefe wurde in 25 ccm Wasser durch 4n-Ammoniak auf pH 8 reagiert und unter Toluolzusatz während 48 Stunden bei Zimmertemperatur autolysiert; wobei pH=7,5-8,5 eingehalten wurde. Der zentrifugierte klare Autolysensaft wurde, mit 1/2 Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung zugesetzt, zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in verdünntem Ammoniak gelöst, vom Ungelösten durch Zentrifugieren befreit und nochmals mit Ammonsulfat gefällt. Der Niederschlag wurde in verdünntem Ammoniak gelöst und durch Zentrifugieren vom unlöslichen Bestandteil gereinigt. Die erhaltene Diaphoraselösung, im Eissschranck bewahrt, ist während etwa 2 Tage wirksam.

II. BETEILIGUNG DER DEHYDRASEKOMPONENTEN AN *Hansenula*-DEHYDRASEN (Bedürfnis des Coferments usw.).

Erstens wurde versucht, zu prüfen, ob Codehydrase und Diaphorase an der Dehydrierung von Äthylalkohol oder Milchsäure durch das *Hansenula*-Enzympräparat beteiligt sind oder nicht.

Unter Anwendung des aus untergäriger Bierhefe isolierten und kristallisierten Proteins (Dehydrase) haben NEGELEIN und WULFF¹⁾ bestätigt, dass die Cozymase (Diphosphopyridinnucleotid) die prosthetische Gruppe der Alkoholdehydrase ist. Andererseits, betreffs der Rolle der Diaphorase („coenzyme factor“, ein Alloxazinadenindinucleotid) im Dehydrasesystem wurde von GREEN u.a.²⁾ und von EULER und MITARBEITERN³⁾ festgestellt, dass die Diaphorase die Wasserstoffübertragung von der durch Substrat reduzierten Codehydrase über das Acceptorsystem wie Methylenblau und Cytochrom katalysiert. Neuerdings haben OKUNUKI und YAKUSHIJI⁴⁾ nachgewiesen, dass die Diaphorase im Mechanismus der Zellatmung zwischen Cytochrom b und Dehydrasesystem eingeschaltet ist.

Wie in der Tabelle XII ersichtlich, ist die Unentbehrlichkeit der Cozymase für Alkoholdehydrase von *Hansenula*-Hefe unbedingt. Die *Hansenula*-Dehydrase ist nicht imstande, wie Alkoholdehydrasen anderer Organismen, bei Abwesenheit der Cozymase Äthylalkohol zu dehydrieren. Die Diaphorase beteiligt sich auch an der Alkoholdehydrierung, und die Methylenblaureduktion wird dadurch bedeutend beschleunigt. Aber wahrscheinlich wegen der noch im Enzympräparat als Verunreinigung vorhandenen Diaphorase oder verwandten Wirkstoffe mit analoger Aktivität besitzt das Enzym nur mit Cozymase jedoch ohne Diaphorase eine Fähigkeit, Äthylalkohol zu dehydrieren, obwohl die Reaktion im Vergleich mit derjenigen unter Zugabe von Diaphorase langsamer verläuft. Es ist dabei beachtenswert, dass die Enzymlösung nach Dialyse noch etwas gelb gefärbt ist, und diese gelbe Substanz, vermutlich das freie oder gebundene Flavin, dürfte für diese Wirkung verantwortlich

- 1) E. NEGELEIN und H. J. WULFF: Biochem. Ztschr., **293** (1937), 351.
- 2) J. G. DEWAN und D. E. GREEN: Nature, **140** (1937), 1097; Biochem. Journ., **31** (1937), 2327; **32** (1938), 626, 1200.
- 3) H. v. EULER und H. HELLSTRÖM: Ztschr. f. physiol. Chem., **252** (1938), 31; Naturwiss., **26** (1938), 676.
- 4) K. OKUNUKI und E. YAKUSHIJI: Proc. Imp. Acad. Tokyo, **16** (1940), 144.

Tabelle XII.

Dehydrierung des Äthylalkohols.

Enzym: 0,5 g Acetonpräp. in 5 ccm M/10 Phosphat. Zentrifugierung. Dialyse 3 Stde.

Cozymase: 5 mg Präp. in 5 ccm Wasser.

Diaphorase: wie beschrieben.

Äthylalkohol: M/10.

Phosphatpuffer: M/2, pH 7,6.

Methylenblau: M/1000.

Versuch	1	2	3	4	5	6
Enzym (ccm)	0,5	0,5	0,5	0,5	—	0,5*
Cozymase (ccm)	0,4	—	0,4	0,4	0,4	0,4
Diaphorase (ccm)	0,4	0,4	—	0,4	0,4	0,4
Äthylalkohol (ccm)	0,3	0,3	0,3	—	0,3	0,3
Phosphatpuffer (ccm)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Methylenblau (ccm)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Wasser (ccm)	—	0,4	0,4	0,3	0,5	—
Mb-Entfärb.-zeit (Min.)	12	>120	20	>120	>120	>120

* Auf 53° während 30 Min. erwärmte Enzymlösung.

sein. Die *Hansenula*-Enzymlösung wurde inaktiviert, nachdem sie auf 53° während 30 Minuten vorerwärmt worden war, und verlor ihre dehydrierende Wirksamkeit gegen Äthylalkohol (siehe sechste Kolumne der Tabelle XII).

Im Gegensatz zu Alkoholdehydrase erfordert die Lacticodehydrase der betreffenden Hefe in ihrer Wirksamkeit keine Mitwirkung der Codehydrase (Tabelle XIII). Die Entbehrlichkeit der Codehydrase für die Methylenblau-reduktion durch Lacticodehydrase der Hefe ist schon von ADLER und MICHAELIS¹⁾ nachgewiesen worden und dieselbe Entbehrlichkeit ist auch der Fall bei *Hansenula*-Dehydrase. Die Diaphorase beschleunigt die Milchsäuredehydrierung durch *Hansenula*-Dehydrase wie bei Alkoholdehydrierung.

1) E. ADLER und M. MICHAELIS: Ztschr. f. physiol. Chem., **235** (1935), 154.

Tabelle XIII.

Dehydrierung der Milchsäure.

Enzym: 0,5 g Acetonpräp. in 5 ccm M/10 Phosphat. Zentrifugierung. Dialyse 4 Stde.

Cozymase und Diaphorase: wie in der Tabelle XII.

Milchsäure: M/6.

Phosphatpuffer: M/2, pH 7,2.

Methylenblau: M/2000.

Versuch	1	2	3	4	5	6
Enzym (ccm)	0,5	—	0,5	0,5	0,5	0,5
Cozymase (ccm)	0,3	0,3	—	0,3	0,3	—
Diaphorase (ccm)	0,5	0,5	0,5	—	0,5	—
Milchsäure (ccm)	0,3	0,3	0,3	0,3	—	0,3
Phosphatpuffer (ccm)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Methylenblau (ccm)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Wasser (ccm)	—	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8
Mb-Entfärb.-zeit (Min.)	10,5	>100	11,5	44,0	>100	46,0

III. VERSCHIEDENE DONATOREN.

Dialysierte Enzymlösung aus Acetonpräparat von *Hansenula anomala* wurde über ihre Dehydraseaktivität in Gegenwart verschiedener Wasserstoffdonatoren versucht. Die Resultate dieser Versuchsreihen sind in der Tabelle XIV zusammengestellt. In der Tabelle kann man die ausserordentlich starke Aktivität der Alkoholdehydrase in diesem Enzympräparat bemerken. Daneben enthält die Enzymlösung Malico-, Lactico- und Succinodehydrase. Brenztraubensäure und Acetaldehyd wurden als H-Donator für das *Hansenula*-Enzym vollständig unbrauchbar gefunden. Es ist hier eine interessante Tatsache, dass, gegenüber der Unbrauchbarkeit der Bernsteinsäure für intakte *Hansenula*-Zelle in aeroben manometrischen Versuchen (siehe hierzu Tabelle I), die extrahierte Enzymlösung die genannte Dicarbonsäure, obwohl nur in herabgesetzter Geschwindigkeit, zu dehydrieren vermag. Betreffs der Beteiligung von Codehydrasen an Hefedehydrasen ist es bestätigt worden, dass Alkohol- und Malicodehydrase¹⁾ Codehydrase I benöti-

1) H. v. EULER, E. ADLER und G. GÜNTHER: Ztschr. f. physiol. Chem., **247** (1937), 65.

Tabelle XIV.

Dehydrierung von verschiedenen Substraten.

Die Zusammensetzung des Versuchsmediums in THUNBERG-Röhren war wie folgt:

0,4 ccm	Enzym (0,5 g in 10 ccm),
0,2 ccm	Codehydrase (5 mg in 5 ccm) oder dest. Wasser,
0,2 ccm	Substrat (M/6),
0,1 ccm	Phosphatpuffer (M/2, pH 7,2),
0,1 ccm	Methylenblau (M/4000).
Gesamtvolum: 1,0 ccm.	
Ohne Zusatz der Diaphorase.	

Substrat	Mb-Entfärbungszeit in Min.	
	Mit Codehydrase	Ohne Codehydrase
Ohne Substrat	87	>120
Äthylalkohol	5	35
Glucose	60	87
Ameisensäure	71	>120
Essigsäure	71	>120
Bernsteinsäure	37	40
Fumarsäure	71	>120
Äpfelsäure	11	52
Citronensäure	57	67
Milchsäure	35	40
Brenztraubensäure	>120	>120
Acetaldehyd	>120	>120
Äthylalkohol*	>120	>120

* Ohne Enzym.

gen und Citricodehydrase¹⁾ Codehydrase II benötigt. Bei meinen Versuchen über *Hansenula*-Enzym wurde es auch nachgewiesen, dass die Cozymase für Malicodehydrase notwendig ist.

IV. VERSCHIEDENE ALKOHOLE.

Nach MÜLLER²⁾ dehydriert der mit Alkohol-Äther gefällte Mazerationsaft von untergäriger Bierhefe in Gegenwart von Methylen-

- 1) H. v. EULER, E. ADLER, G. GÜNTHER und L. ELLIOTS: *Enzymol.*, **6** (1939), 337.
- 2) D. MÜLLER: *Biochem. Ztschr.*, **268** (1934), 152.

blau zahlreiche monovalente Alkohole, mit Ausnahme von Methyl- und *iso*-Amylalkohol, und polyvalente Alkohole wie Äthylenglykol, Mannit, Sorbit und Dulcit.

Verschiedene Alkohole wurden auf ihre H-Donatorwirkung für die *Hansenula*-Dehydrase vergleichend geprüft. Wie es bei den schon beschriebenen manometrischen Versuchen von intakten Organismen den Fall war, werden *n*-Propyl- und *n*-Butylalkohol durch extrahierte Dehydrase als Wasserstoffdonator verhältnismässig gut verbraucht. Methylalkohol wurde nicht angegriffen. Ohne Mitwirkung der Codehydrase wurden keine Alkohole dehydriert. Die Notwendigkeit von Cozymase für Dehydrierung von Methyl-, Propyl- und Amylalkohol ist von EULER und Mitarbeitern¹⁾ bei Bierhefedehydrase und von LUTWAK-MANN²⁾ bei Leberdehydrase nachgewiesen worden.

Tabelle XV.

Dehydrierung von verschiedenen Alkoholen.

Endkonzentration der Alkohole: M/10
 Endkonzentration des Methylenblaus: M/40000
 pH 7,6
 Andere Komponenten wie in der Tab. XIV.

Alkohol	Mb-Entfärbungszeit in Min.
Methylalkohol	100
Äthylalkohol	8,5
<i>n</i> -Propylalkohol	9,5
<i>iso</i> -Propylalkohol	37
<i>n</i> -Butylalkohol	12
<i>iso</i> -Butylalkohol	42
Äthylenglykol	98
Mannit	53
Ohne Zusatz	90

Ohne Cozymase bzw. ohne Enzym geschah keine Entfärbung des Methylenblaus in allen Fällen.

Wie aus der Tabelle XV ersichtlich, ist es zweifellos, dass Mannit eine Verkürzung der Methylenblauentfärbungszeit hervor-

- 1) H. v. EULER, E. ADLER und H. HELLSTRÖM: Ztschr. f. physiol. Chem., **241** (1936), 239.
- 2) C. LUTWAK-MANN: Biochem. Journ., **32** (1938), 1364.

ruft. In 1937 hat MÜLLER¹⁾ über die Mannitdehydrase der Bierhefe mitgeteilt. Er hat diese Dehydrase von der gewöhnlichen Alkoholdehydrase unterschieden und berichtet, dass die Mannitdehydrase ohne Mitwirkung der Codehydrase unwirksam ist. Ich habe über das Codehydrase-Bedürfnis der Mannitdehydrase von *Hansenula*-Hefe Versuche gemacht; dabei habe ich konzentriertere Dehydraselösung und verdünntere Methylenblaulösung als bei Tabelle XV verwendet, um diese Verhältnisse klarer zu machen. Aus der Tabelle XVI geht hervor, dass die Dehydrierung von Mannit bei der dialysierten *Hansenula*-Dehydrase durch mein Codehydrase-Präparat in geringem Masse beschleunigt wird.

Tabelle XVI.

Dehydrierung des Mannits.

Enzym: 0,5 g in 5 ccm.

Methylenblau: M/80000.

Andere Komponenten wie in der Tabelle XV.

Versuchskomponenten	Mb-Entfärbungszeit in Min.
Ohne Substrat	50
Äthylalkohol	2,5
Äthylalkohol ohne Cozymase	11
Mannit	12
Mannit ohne Cozymase	17

V. ALKOHOLDEHYDRASE.

Als Nächstes wurden einige Faktoren bei der Dehydrierung des Äthylalkohols durch *Hansenula*-Enzym studiert.

1. Abhängigkeit der Donatorkonzentration.

Man kann die Einflüsse von den schrittweisen Veränderungen der Äthylalkoholkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit in der Tabelle XVII ersehen. Die optimale Substratkonzentration für die Alkoholdehydrase von *Hansenula anomala* liegt bei 2 M Alkohol.

1) D. MÜLLER: Enzymol., 3 (1937), 26.

Tabelle XVII.

Abhängigkeit der Äthylalkoholkonzentration.

Die Komponenten wie in der Tabelle XII.
Mit Diaphorasezusatz.

Äthylalkoholkonzentration	Mb-Entfärbungszeit in Min.
10M	8,5
5M	8,0
2M	7,0
1M	8,5
M/2	9
M/5	9
M/10	10
M/20	11
M/40	15
M/100	15
M/200	30

Nach den früheren Arbeiten von WIELAND und seinen Mitarbeitern¹⁾ ist die Alkoholdehydrase aus Bierhefe in breitem Bereich unabhängig von der Substratkonzentration. Diese Autoren fanden z.B., dass die Alkoholkonzentrationen von M/4 bis M/120 praktisch keine merklichen Unterschiede der Reaktionsgeschwindigkeit hervorrufen. Die optimale Substratkonzentration für die Alkoholdehydrase aus Rübe liegt nach YAMAGATA und NAGAHISA²⁾ bei 1 Mol Alkohol und dieselbe Dehydrase aus den *Lilium*-Pollen liegt nach OKUNUKI³⁾ bei 1–2 Mol Alkohol.

2. pH-Abhängigkeit.

Der Einfluss von pH auf die Dehydrierung des Äthylalkohols mit *Hansenula*-Dehydrase ist bei Ab- und Anwesenheit der zusätzlichen Diaphorase etwas verschieden. So liegt das pH-Optimum bei Abwesenheit der Diaphorase bei pH 7,6 (siehe Tabelle XVIII). Dagegen ist das pH-Optimum ziemlich breit, wenn Diaphorase im Reak-

- 1) H. WIELAND und A. BERTHO: LIEBIGS Ann. Chem., **467** (1928), 95; H. WIELAND und O. B. CLAREN: Ebenda, **492** (1932), 183.
- 2) S. YAMAGATA und M. NAGAHISA: Acta Phytochim., **9** (1937), 115.
- 3) K. OKUNUKI: Ebenda, **11** (1939), 65.

tionsmedium zugesetzt wird, und die Reaktion verläuft im Bereich von pH 7,2 bis pH 9,0 mit derselben Geschwindigkeit (siehe Tabelle XIX). Für dieses breite pH-Optimum auf der alkalischen Seite, wenn die Diaphorase an der Reaktion beteiligt ist, ist vermutlich die Günstigkeit der Diaphorasewirkung bei niedriger H-Ionenkonzentration verantwortlich. Nach MÜLLER¹⁾ ist das pH-Optimum der Acetonbildung aus *iso*-Propylalkohol durch Alkoholdehydrase von Bierhefe ziemlich breit, zwischen 7 und 10.

Tabelle XVIII.

pH-Abhängigkeit der *Hansenula*-Alkoholdehydrase in Abwesenheit von Diaphorase.

Äthylalkohol: M/10.

Methylenblau: M/20000.

Andere Komponenten wie in der Tabelle XIV.

pH	4,5	5,0	6,0	6,4	6,8	7,0	7,2	7,6	8,0	9,0
Mb-Entfärb.-zeit (Min.)	>200	>200	200	77	29	22	16	10	14	14

Tabelle XIX.

pH-Abhängigkeit der *Hansenula*-Alkoholdehydrase in Anwesenheit von Diaphorase.

Äthylalkohol: M/20.

Methylenblau: M/10000.

Andere Komponenten wie in der Tabelle XII.

pH	5,0	6,0	6,4	6,8	7,0	7,2	7,6	8,0	9,0
Mb-Entfärb.-zeit (Min.)	100	50	30	22	22	16	16	16	16

3. Einfluss von Semicarbazid.

Vor kurzem berichtete STILL²⁾ bei Versuchen von zellfreien Extrakten aus *B. coli*, dass die Dehydrierung des Äthylalkohols mittels

1) D. MÜLLER: Biochem. Ztschr., **268** (1934), 152.

2) J. L. STILL: Biochem. Journ., **34** (1940), 1177.

Semicarbazids beschleunigt wird, welches, wie angenommen wird, hierbei als Blockierungsmittel des durch Dehydrierung aus Äthylalkohol gebildeten Produktes, nämlich des Acetaldehyds, dient. Dieselbe Wirkung des Semicarbazids wird bei der Alkoholdehydrase von *Hansenula anomala* beobachtet, wie in folgender Tabelle gezeigt ist.

Tabelle XX.

Einfluss des Semicarbazids auf *Hansenula*-Alkoholdehydrase.

Enzym: 0,5 g Acetonpräp. in 10 ccm Phosphat.

Cozymase: wie in der Tabelle XII.

Versuch	1	2
Enzym (ccm)	0,3	0,3
Cozymase (ccm)	0,2	0,2
Äthylalkohol (ccm)	0,1	0,1
Puffer (M/2, pH 7,6) (ccm)	0,1	0,1
Semicarbazid (2 M) (ccm)	0,2	—
Methylenblau (M/500) (ccm)	0,1	0,1
Wasser (ccm)	—	0,2
Mb-Entfärb.-zeit (Min.)	45	60

4. Einfluss von Monojodessigsäure.

DIXON¹⁾ fand, dass die Alkoholdehydrase der Hefe durch M/1000 Monojodessigsäure nach 20-minütiger Incubation vollständig gehemmt wird. Nach STILL²⁾ wirkt die genannte Substanz in M/500-Konzentration nach 5-minütiger Incubation auf *Coli*-Dehydrase um 75% hemmend. Auch bei meinem Dehydrasepräparat aus *Hansenula*-Hefe erfährt die Dehydrierung des Äthylalkohols durch M/1000 Monojodessigsäure nach Incubation von 10–60 Minuten bedeutende Hemmung (vgl. Tabelle XXI). Ohne Incubationszeit bietet M/1000 Monojodessigsäure, wie es von DIXON berichtet wurde, keinen hemmenden Einfluss. Dieselbe Substanz in M/100 übt ohne Incubationszeit schwächere Hemmung auf die *Hansenula*-Alkoholdehydrase.

1) M. DIXON: *Nature*, **140** (1937), 806.

2) J. L. STILL: loc. cit.

Tabelle XXI.

Einfluss der Monojodessigsäure auf die *Hansenula*-Alkoholdehydrase.

Die Zusammensetzung des Versuchsmediums in THUNBERG-Röhren war wie folgt:

0,3 ccm	Enzym	}.....im Hauptraum,
0,1 ccm	Phosphatpuffer (M/2, pH 7,6)	
0,1 ccm	Methylenblau (M/1000)	
0,2 ccm	Cozymase	}.....im Ansatz,
0,2 ccm	Äthylalkohol (M/5)	
0,1 ccm	Monojodessigsäure (M/10, M/100 oder M/1000, neutralisiert)	im Hauptraum oder im Ansatz.
Incubation: 10 Min., 30 Min. oder 60 Min. bei 30°.		

Monojodessigsäure	Mb-Entfärbungszeit in Min.
Ohne Monojodessigsäure	6
Monojodessigsäure im Hauptraum (M/1000)	
10-minutige-Incubation	49
30-minutige-Incubation	98
60-minutige-Incubation	>120
Monojodessigsäure im Ansatz (60-minutige-Incubation)	
M/1000	6
M/1000	5,8
M/100	38

Schlussbetrachtungen

Auf Grund bisher vorliegender Versuchsergebnisse sowohl bei Sauerstoffaufnahme von intakten Zellen als auch bei Methylenblau-reduktion von extrahierten Dehydraselösungen kann man mit Recht behaupten, dass *Hansenula anomala* gegen Äthylalkohol unter anderen Substraten spezifisch grosse Affinität besitzt. Betreffs anderer atmungsphysiologischen Eigentümlichkeiten genannter Hefe ist kein besonderer Unterschied im Vergleich mit den gewöhnlichen Kulturhefen mehr vorhanden. So z.B. sind erstens das Cozymase-Bedürfnis der Dehydrierung von Äthylalkohol, Äpfelsäure usw., zweitens die Nichtbeteiligung der Codehydrase an Lacticodehydrase, gegenüber der Notwendigkeit der Cozymase bei der Wirkung von Lacticodehydrase aus tierischen Geweben, und ferner die Hemmfähigkeit der Monojodessigsäure gegenüber der Alkoholdehydrierung

alle die allgemeinen Eigenschaften der Hefe-Dehydrase, und *Hansenula anomala* bildet dabei keine Ausnahme.

In betreff der hemmenden Wirkung der Monojodessigsäure auf die Alkoholdehydrase sind die früheren Mitteilungen anderer Autoren je nach der Herkunft der betreffender Dehydrase sehr verschieden. DIXON¹⁾ fand als Erster die vollkommene Inaktivierung der Hefe-Alkoholdehydrase durch Monojodessigsäure. Dagegen berichtet LUTWAK-MANN²⁾ nur geringere Hemmungswirkung dieser Halogenessigsäure auf die Alkoholdehydrase von tierischen Geweben und *Acetobacter suboxydans*. Nach STILL³⁾ erfuhr die Alkoholdehydrase von *B. coli* bedeutende Hemmung. Auf mein Enzympräparat aus *Hansenula anomala* übte Monojodessigsäure eine vollkommene Hemmung aus.

Hansenula anomala oxydiert neben Äthylalkohol verschiedene andere ein- und mehrwertige Alkohole. Unter der gewöhnlichen Bezeichnung Alkoholdehydrasen werden mehrere verschiedene Dehydrasen zusammengefasst. Die Frage, ob es gegen verschiedene Alkohole eine oder mehrere spezifische Alkoholdehydrasen gibt, bleibt heute noch offen. THUNBERG⁴⁾ ist neuerdings darauf zurückgekommen und wirft die Frage auf, ob zwischen Methylalkohol- und Äthylalkoholdehydrase zu unterscheiden ist. D. MÜLLER⁵⁾ wie schon erwähnt, unterscheidet die Mannitdehydrase von der Alkoholdehydrase. Sein Präparat der Mannitdehydrase dehydrierte nicht Methylalkohol, Äthylalkohol, Glycerin, Erythrocif, Sorbit und Dulcit. Die vorliegende Arbeit über *Hansenula anomala* ist für die zur Discussion stehende Frage zwar nicht beweisend, aber es ist aus den Versuchen klar, dass mein rohes Dehydrasepräparat Mannit neben den einwertigen Alkoholen dehydriert.

Die Abbauvorgänge des Äthylalkohols durch die Hefe sind von WIELAND folgendermassen angenommen worden: Äthylalkohol → Acetaldehyd → Essigsäure → Bernsteinsäure. Nach dem THUNBERG-schen Schema wird Essigsäure über Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Oxalessigsäure, Brenztraubensäure erneut in Essigsäure umgewandelt. Auf Grund der manometrischen Versuche lag es nahe

1) M. DIXON: loc. cit.

2) C. LUTWAK-MANN: Biochem. Journ., **32** (1938), 1364.

3) J. L. STILL: loc. cit.

4) T. THUNBERG: Skand. Arch. Physiol., **75** (1936), 39.

5) D. MÜLLER: loc. cit.

anzunehmen, dass Äthylalkohol durch *Hansenula anomala* über Acetaldehyd und Essigsäure weiter oxydiert wird. Auch vom praktischen Standpunkt aus ist es ungünstig, dass Acetaldehyd oder Essigsäure im Verlauf der Reisweingärung sich anhäufen, da schlechter Geschmack im Reiswein entstehen muss, wenn diese Substanzen in beträchtlicher Menge erzeugt werden. Wie schon erwähnt, dient *Hansenula anomala* als Nachgärer in der Reisweinindustrie, und es ist folglich daraus die Vermutung ausgesprochen worden, dass diese Hefe die durch Alkoholoxydation entstandene Essigsäure weiter in Bernsteinsäure, Fumarsäure usw. oxydiert, und dass diese organischen Säuren im Gegensatz zur Essigsäure, als Geschmacks-erreger des japanischen Reisweins in Frage kommen.

Wie schon bei der Oxydation der Bernsteinsäure erwähnt wurde, spielt die Durchlässigkeit der Hefemembran für die Substrate bei den stoffwechselphysiologischen Untersuchungen der Hefe eine Rolle. Folglich muss dabei das spezifische Permeabilitätsproblem der Plasmamembranen von lebenden Hefen berücksichtigt werden. Im Vergleich mit den Atmungsversuchen der Bakterien gibt es ferner bei der Hefe eine andere experimentelle Schwierigkeit, dass nämlich die intakte Hefe sehr reich an eigenen Gehaltstoffen ist und deshalb ohne Zugabe des Atmungssubstrats von aussen starke Atmung und Methylenblauentfärbungsvermögen zeigt. Aber unter Berücksichtigung dieser Tatsache und unter möglicher Beseitigung dieser Schwierigkeiten wird der Atmungsmechanismus der Hefe noch klarer. Dabei scheint *Hansenula anomala*, wegen ihrer besseren Wachstumsgeschwindigkeit als andere Kulturhefen, ein für diese Untersuchungen günstiges Versuchsmaterial zu sein.

Zusammenfassung

1. Die Sauerstoffaufnahme der intakten Zellen von *Hansenula anomala* mittels des BARCROFTSchen Manometers und die Methylenblaureduktion der extrahierten Dehydraselösungen aus genannter Hefe mittels der THUNBERGSchen Technik wurden versucht.
2. Aus den Versuchen *in vivo* und *in vitro* geht hervor, dass die genannte Hefe gegen Äthylalkohol die stärkste Affinität besitzt.
3. Durch die intakte Hefe wurden neben Äthylalkohol Glucose, Milchsäure, Brenztraubensäure, Acetaldehyd u.a. oxydiert. Dagegen

waren Bernsteinsäure, Äpfelsäure und Citronensäure durch die intakte *Hansenula*-Zelle schwer angreifbar.

4. Einige Aminosäuren wurden geprüft und gezeigt, dass sie als Atmungssubstrat nicht sehr günstig sind.

5. Verschiedene ein- und mehrwertige Alkohole wurden auf ihre Brauchbarkeit durch die Hefe versucht. Mit Ausnahme des Methylalkohols, sinkt die Oxydationsgeschwindigkeit bei einwertigen Alkoholen mit zunehmender C-Atomzahl herab.

6. Bei der Oxydation des Äthylalkohols wurden einige Versuche gemacht, wie z.B. betreffend Abhängigkeit der Reaktion von der Alkoholkonzentration und von pH, sowie betreffend vollständige Oxydation des Alkohols usw.

7. Semicarbazid wirkt auf den durch Oxydation des Alkohols gebildeten Acetaldehyd blockierend.

8. KCN-Hemmung der Atmung von *Hansenula anomala* wurde versucht.

9. Die hergestellte Dehydraselösung aus Aceton-Hefe bedarf die Mitwirkung der Cozymase für die Oxydation des Äthylalkohols, dagegen braucht die Oxydation der Milchsäure keine Codehydrase.

10. Das Dehydrasepräparat ist imstande, Bernsteinsäure und Äpfelsäure zu dehydrieren, dagegen werden Acetaldehyd und Brenztraubensäure nicht dehydriert.

11. Niedere einwertige Alkohole und Mannit können durch diese Dehydrase unter Mitbeteiligung der Codehydrase dehydriert werden.

12. Beteiligung der Diaphorase an der Dehydrierung des Äthylalkohols und der Milchsäure wurde festgestellt.

13. Optimale Alkoholkonzentration und optimales pH der Alkoholdehydrase von *Hansenula anomala* wurden bestimmt.

14. Semicarbazid beschleunigt die Alkoholdehydrasewirkung.

15. Monojodessigsäure hemmt die Alkoholdehydrase von *Hansenula*-Hefe.

An dieser Stelle erfülle ich gern die Pflicht, Herrn Prof. emer. Dr. K. SHIBATA an der Kaiserlichen Universität zu Tokyo für seine gütige Leitung und stetige Anregung meinen ergebensten Dank zu sagen. Auch sei es mir gestattet, Herrn Prof. Dr. T. SAKAMURA

vom hiesigen Institut für seine vielseitige Unterstützung bei der Ausführung dieser Untersuchungen herzlichst zu danken. Ferner danke ich gern Herrn Prof. Dr. H. TAMIYA an der Kaiserlichen Universität zu Tokyo für seine stete Anregung.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Hilfe des vom Unterrichtsministerium gewährten Forschungsstipendium ausgeführt.
