

E E 16/12

MATHEMATIKAI  
ÉS  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI  
ÉRTESITŐ.

A M. TUD. AKADÉMIA III. OSZTÁLYÁNAK FOLYÓIRATA.

SZERKESZTI

FRÖHLICH IZIDOR

OSZTÁLYTITKÁR.

---

*Különnyomat a XXXIII. kötet 3. füzetéből.*

A ZIMÁZ ÉS KARBOXILÁZ ENZÍMEK A BURGONYA  
ÉS A CZUKORRÉPA RAKTÁROZÓ SZERVÉBEN.

BODNÁR JÁNOS-tól.

---

BUDAPEST.

KIADJA A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA.

1915.

# A ZIMÁZ ÉS KARBOXILÁZ ENZÍMEK A BURGONYA ÉS A CZUKORRÉPA RAKTÁROZÓ SZERVÉBEN.<sup>1</sup>

BODNÁR JÁNOS-tól.

A magasabb rendű növények anaërob lélegzése — vagy helyesebben a cukornak a növény szervezetében végbemenő anaërob elbomlása — és az alkoholos erjedés közötti azonosságból következik, hogy mindazoknak a vizsgálatoknak az eredményei, a melyek egyfelől közelebb vezettek bennünket az alkoholos erjedés biochémiájának a megismeréséhez, másfelől lényegesen előbbre vitték a glükóznak a magasabb rendű növények szervezetében végbemenő elézéséről alkotott ismereteinket is. Így például az alkoholos erjedés biochémiájának a fejlődésére nézve korszakotalkotó volt, midőn E. BUCHNER<sup>2</sup> a zimáz előállításával az alkoholos erjedést az élesztőgombák életműködésétől függetlenül is előidézte. BUCHNER felfedezésének fontosságát a magasabb rendű növényeket illetőleg csakhamar igazolták J. STOKLASA-nak<sup>3</sup> és tanítványainak nagyszámú vizsgálatai. STOKLASA a BUCHNER-ALBERT-féle eljárással magasabb rendű

---

<sup>1</sup> Közlemény a m. kir. növényélet- és kórtani állomás kémiai laboratoriumából.

<sup>2</sup> E. BUCHNER—H. BUCHNER—M. HAHN, Die Zymasegärung, 1903. München-Berlin.

<sup>3</sup> J. STOKLASA, J. JELINEK és E. VITEK, Hofmeisters Beitr. 3. (1903.) 460. Különlenyomat. *Ugyanezek*, Zeitschr. f. Zuckerindustr. Böhmen, 27. (1903.) 633. — J. STOKLASA, F. ČERNÝ, J. JELINEK és E. VITEK, Centralbl. f. Bakter. Abt. II. 13. (1904.) 86. — J. STOKLASA, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 22. (1904.) 460. Különlenyomat. — J. STOKLASA, A. ERNST és K. CHOCENSKY, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50. (1907.) 303. és 51. (1907.) 156. Különlenyomatok.

növényekből (cukorrépa, burgonya, borsó és más növények különböző szerveiből) szilárd állapotban oly enzimet tartalmazó præparatumokat állított elő, a melyek a glükózoldatra többek között alkohol és széndioxid keletkezése közben hatottak, s e vegyületek az alkoholos erjedést jellemző — avagy ahhoz igen közeleső — mennyiségi viszonyban keletkeztek.

Az alkoholos erjedés közbeeső termékeinek az ismerete terén lényeges előrehaladásnak tekinthető C. NEUBERG<sup>1</sup> legutóbbi időben tett felfedezése. NEUBERG a piroszőlősavban (Brenztraubensäure) oly vegyületet talált, a mely az élesztőgombák kipréselt nedvének a hatására éppoly könnyen és simán indul erjedésnek, mint maga a glükóz. A piroszőlősav erjedésekor — e nem cukortermesztető vegyületből — széndioxid és acetaldehid keletkezik, ez utóbbi vegyület pedig, hogy NEUBERG szavaival éljek, «zum Alkohol in näherer Beziehung steht, als irgend eine andere Substanz, die jemals mit dem Gärungsproblem in Zusammenhang gebracht worden ist.» A glükóz strukturájából a széndioxidnak direkt lehasadása nem magyarázható, a piroszőlősavból, mint az erjedés egyik közbeeső termékéből — és pedig e sav karboxil csoportjából — egészen könnyen érthető s így megoldottnak tekinthető az a már régen megfejtésre váró probléma, hogy mily módon keletkezik a széndioxid az alkoholos erjedéskor. A piroszőlősavnak ezt az elbomlását a *karboxiláz* enzim végzi, a mely enzim egyik tagja a zimáz-szisztémának. A karboxiláznak a zimáz-rendszerben való önállóságát bizonyítják NEUBERG és P. ROSENTHAL<sup>2</sup> vizsgálatai. Nevezetteknek sikerült a zimázból oly præparatumot előállítani, a mely a glükózoldatot változatlanul hagyta, ellenben a piroszőlősavat széndioxid és acetaldehid keletkezése közben elbontotta.

NEUBERG felfedezése alapján W. ZALESKI és E. MARX<sup>3</sup> a

<sup>1</sup> C. NEUBERG, Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle. Monographie, 1913. Jena.—Biochem. Zeitschr. 71. (1915.) 1. Különlenyomat.

<sup>2</sup> C. NEUBERG és P. ROSENTHAL, Biochem. Zeitschr. 61. (1914.) 171. Különlenyomat.

<sup>3</sup> W. ZALESKI és E. MARX, Biochem. Zeitschr. 47. (1912.) 185., 48. (1912.) 175. — W. ZALESKI, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 31. (1913.) 349., 32. (1914.) 457. Különlenyomatok.

pyroszölősavat s annak *Na*-sóját elbontó enzim — a NEUBERG-féle karboxiláz — jelenlétét néhány magasabb rendű növényben (borsó, *Lupinus*, *Vicia Faba*, búza, tengeri) is kimutatta.

STOKLASA nemcsak magasabb rendű növényekből, hanem az állati szervezetből, így a vérből és különböző szervek kipréselt nedvéből is állított elő zimázt tartalmazó készítményeket. STOKLASA vizsgálatai, a melyek az állati eredetű zimázra vonatkoznak, több kétkedőre találtak (BLUMENTHAL, FREINDSCHMIDT, ARNHEIM és RÖSENBAUM, BENDIX, BATELLI [P. MAZÉ],<sup>1</sup> PORTIER, HARDEN és MACLEAN),<sup>2</sup> a kik tagadják az élesztőgombák zimázához hasonló enzimnek az állati szövetekben való jelenlétét és STOKLASA észleleteit baktériumok hatására igyekeznek visszavezetni. Hogy a nevezett bűvároknak ez az állítása mennyiben felel meg a valóságnak, ma még egyáltalában nincs eldöntve s nem is lesz addig, a míg a vizsgálati anyagban nem találnak alkoholt produkáló baktériumokat oly nagy számban, hogy az azok termelte alkohol mennyisége legalább is közel álljon a STOKLASA kísérleteiben talált alkohol mennyiségéhez.

A mi a zimáznak a magasabb rendű növényekből való előállítását illeti, a STOKLASA vizsgálatain kívül az irodalomban a következő adatokkal, illetve nézetekkel találkozunk, a melyek e kérdést közelebbről érintik.

P. MAZÉ,<sup>3</sup> ki borsómagvakból és a borsó 5—10 cm. hosszú csiranövényeiből igyekezett a zimázt izolálni, a következő végeredményre jutott: «les cellules végétales (et animales) renferment de la zymase puisqu'elles produisent de l'alcool; mais les méthodes d'isolement employées jusqu'ici ne permettent pas de l'extraire.» Ugyancsak P. MAZÉ<sup>4</sup> egy másik értekezésében pedig a következőket mondja: «...les fermentations qui se déclarent dans les milieux qu'ils réalisent sont dues, d'après mes résultats, à des microbes et non à la zymase isolée des cellules végétales (ou animales). Mais je frai remarquer ici une

<sup>1</sup> P. MAZÉ, Ann. Inst. Pasteur 18. (1904.) 535.

<sup>2</sup> C. OPPENHEIMER, Die Fermente und ihre Wirkungen, II. Band. (1913.) 739. Leipzig.

<sup>3</sup> P. MAZÉ, Ann. Inst. Pasteur 18. (1904.) 378.

<sup>4</sup> P. MAZÉ, Ann. Inst. Pasteur 18. (1904.) 535.

fois de plus qu'il ne résulte pas des faits qui précèdent, que les cellules animales et végétales ne renferment pas de zymase. Elles produisent de l'alcool lorsqu'on les prive d'air; et l'on ne peut attribuer sa production qu'à la zymase.»

W. PALLADIN és S. KOSTYTSCHEW<sup>1</sup> «*Anaerobe Atmung, Alkoholgärung und Acetonbildung bei den Samenpflanzen*» czimű dolgozatában a zimázra vonatkozólag a következőket olvashatjuk: «Nach den Untersuchungen STOKLASA's ist auch die anaerobe Atmung der Zuckerrübe mit der Alkoholgärung identisch. Dieser Forscher hat ausserdem die wichtige Tatsache hervorgehoben, dass ihm die Darstellung der Zymase aus verschiedenen pflanzlichen und tierischen Objekten gelungen sei. Da aber eine ganze Reihe von Beobachtungen verschiedener Forscher den Angaben STOKLASA's widerspricht und schlagende Einwände gegen die Methodik des böhmischen Forschers seitens MAZÉ und PORTIER geltend gemacht worden sind, so können wir die Frage von der Darstellung der Zymase aus Samenpflanzen und Tiergeweben noch nicht für abgeschlossen halten.» — «Die Meinung MAZÉ's, GODLEWSKI's und STOKLASA's bezüglich der Anwesenheit der Zymase bei Samenpflanzen wird durch unsere Versuche bestätigt. Es bleibt noch freilich dahingestellt, ob die Zymase der Samenpflanzen mit der Hefezymase identisch ist.»

H. M. VERNON<sup>2</sup> a növényi zimázról a következőket mondja: «...bis aber bestätigende Beweise von anderen Forschern erhalten werden, ist es besser diese scheinbare Isolierung der Pflanzenzymase nicht als bewiesen anzunehmen.»

S. KOSTYTSCHEW,<sup>3</sup> ki a burgonyagumó anaerob lélegzésének tanulmányozásakor a  $C_2H_5OH:CO_2$  arányt — daczára az elegendő mennyiségben jelenlevő czukornak — minden esetben jóval kisebbnek találta,<sup>4</sup> mint az alkoholos erjedésnél, azt a

<sup>1</sup> W. PALLADIN és S. KOSTYTSCHEW, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48. (1906.) 215.

<sup>2</sup> L. ASHER u. K. SPIRO, Ergebnisse der Physiologie 9. (1910.) 210.

<sup>3</sup> S. KOSTYTSCHEW, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 31. (1913.) 125. Különlenyomat.

<sup>4</sup> STOKLASA a burgonyagumó anaerob lélegzési folyamatának a vizsgálatakor azt találta, hogy a  $C_2H_6O:CO_2$  arány ( $CO_2=100$ ) 81·9, 109·7,

valószínű következtetést vonta le, hogy e jelenség a zimáznak a burgonyagumóban való hiányára vezethető vissza.

A gyakorlatra nézve rendkívül fontos a földből kiszedett burgonyának és cukorrépanak hosszabb időre nyuló oly módon való eltartása, hogy a keményítő-, illetve a cukortartalom csökkenése a lehető legkevesebb legyen. Tudjuk, hogy a tartalék-táplálék csökkenésének oka főrészből az illető szerveknek a lélegzési folyamatára vezethető vissza s így nemcsak tudományos, hanem gyakorlati szempontból is nagy fontossággal bír, hogy a növények lélegzési folyamatában oly jelentős szerepet játszó zimáz előállításának lehetősége a burgonya és cukorrépa raktározó szervéből — hivatkozással a fentebb említett nézetekre, valamint az állati eredetű zimázzal elmondottakra — véglegesen tisztázódjék.

Máglyákba rakott burgonyánál és cukorrépanál a máglya belsejében a lélegzés anaërob módon történik, tehát az ekkor keletkező széndioxid az alkoholos erjedés analogiájára csakis a karboxiláz hatására keletkeznek a piroszőlősavból, mint a növényi lélegzés egyik — nagyon valószínű — közbeeső termékéből.

Ha a burgonya és cukorrépa raktározó szervéből izolált s zimázt tartalmazó nyers enzim — minthogy a karboxiláz egyik tagja a zimáz-szisztémának — a piroszőlősavra a karboxilázt jellemző módon hat, akkor a karboxiláz előállításának kérdése az említett növényi szervekből megoldottnak tekinthető, ez pedig többek között újabb bizonyíték volna a mellett, hogy a burgonya és a cukorrépa zimáza azonos az élesztőgombák zimázával.

A zimáz előállításakor s a glükózoldatra való hatásának a vizsgálatakor lényegében STOKLASA szerint jártam el s ezért a következőkben az egész vizsgálat menetének a részletes ismertetése helyett csupán csak azokról a műveletekről fogok be-

---

1148. Ezzel szemben KOSTYTSCHEW I. II. III. IV. V. VI. adatokat kapta, 50, 35, 28, 18, 7, 0 amelyek közül csak az V. vonatkozik rendes nyugvó gumóra, mert a III. traumatikus inger hatásának volt kitéve, az I., II., IV. gumókban lehülés útján növelte a cukortartalmat (a II. gumónál ezenkívül még traumatikus inger is szerepelt), végül a VI. csirázó gumó volt.

hatóbban szólni, a melyeket STOKLASA eljárásában a közölt eredeti módszertől eltérően végeztem. Ezeket a módosításokat részben technikai okokból, főleg azonban a kitűzött feladat legexaktabb (minden kétséget vagy ellenvetést kizáró) megoldásának biztosítása céljából alkalmaztam.

Már itt előrebocsátom, hogy különös gondot fordítottam a vizsgálataimhoz használt burgonya és cukorrépa egészségi állapotára, mert e körülmény figyelembevételre (l. a II. és III. táblázat adatait) éppen a baktériumok állítólagos szereplését illetőleg bir nagy fontossággal.

A 0·5%-os szublimátoldattal 30 percig sterilizált és csíra-mentes desztillált vízzel lemosott növényi szerveket a SUCKOW-féle répaörlővel finom péppé őröltem s a nyert pépet a BUCHNER-sajtóval 300—400 atmoszféra-nyomáson kipréseltem. A kipréselt léből alkohol-éter keverékével nyert csapadékot steril fehér vászon keresztül gyorsan leszűrtem s a kapott nyers enzim szárítását gondosan sterilizált vákuumban végeztem.

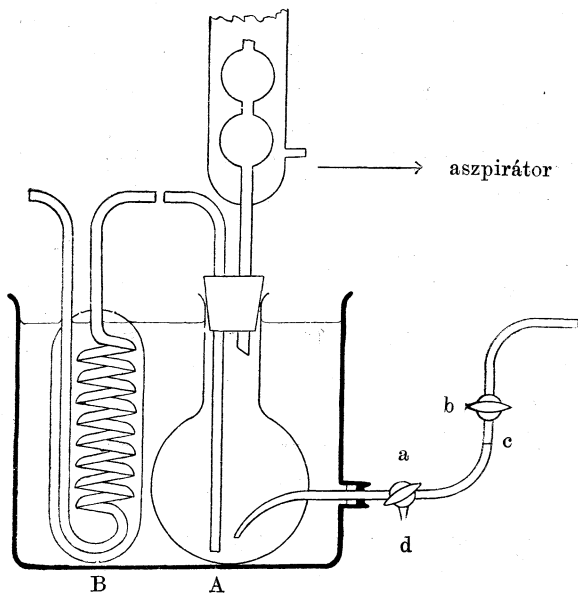
Vákuum-edénynek SCHEIBLER-féle üvegcsapos exsikkátort használtam, a melynek az aljára 30—40 cm<sup>3</sup> toluolt öntöttem. Arról, hogy a vákuum belseje az enzim kiszáritási ideje alatt csakugyan csirától mentes volt, egy alkalommal a következő módon győződtem meg. Mikor a nyers enzimet az exsikkátorba tettem, egyidejűleg lapos porcelláncsészékbe öntött 20—20 cm<sup>3</sup> körülbelül 20%-os sterilizált nádcukor- és glükózoldatot is elhelyeztem abban s a szárítás befejezése után meghatároztam az oldatok cukortartalmát és megvizsgáltam, hogy az oldatok, valamint a nyers enzim is nem tartalmaznak-e baktériumokat.

I. táblázat.

Nádcukor %		Glükóz %		Vizsgálat baktériumra
száritás		száritás		
előtt	után	előtt	után	
19·81	19·75	19·60	19·64	negatív

E táblázat adatai bizonyítják, hogy a kiszáritás ideje alatt a nyers enzimnek baktériumokkal való esetleges megfertőzése teljesen kizártnak tekinthető.

A. HARDEN<sup>1</sup> szerint STOKLASA a vizsgálatai alkalmával azért nem talált baktériumokat, mert későn — a meghatározás befejez-



1. ábra.

tével — kereste azokat az erjedő cukoroldatban, a mikor is a baktériumok már mind elpusztultak volna.

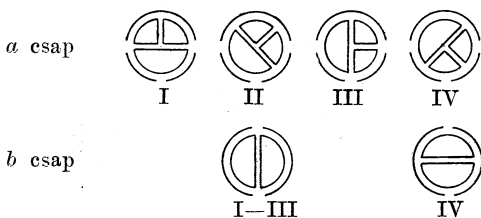
A. HARDENnek ezt a megjegyzését figyelembe véve, a nyers enzimben foglalt zimáznak a glükózoldatra való hatását az alábbi szerkezettel bíró lombikban vizsgáltam.

500 cm<sup>3</sup>-es kerekaljú lombik (A) oldalába az 1. ábrán feltüntetett módon egy hármás- (a) s egy kettős-fúratú (b) csappal ellátott üvegcsövet forrasztottam, a mely üvegcső segítségével a lombik tartalmát baktériumok jelenlétére már a meg-

<sup>1</sup> C. OPPENHEIMER, Die Fermente und ihre Wirkungen, Band II. (1913.) 739. Leipzig.

határozás kezdetétől fogva s annak egész tartama alatt — a kísérlet menetének lényegesebb megzavarása nélkül — vizsgálhattam.

A baktériológiai vizsgálathoz szükséges folyadékpróbának a lombikból való kivételét a következő módon végezzük. Az *a* és *b* csapok megfelelő állítása után (2. ábra I.) a toldalékeső végéhez kapcsolt mosópalaczkon (koncentrált lúgoldattal volt megtöltve) és szárítótornyon (Bruns-gyapotot és közte elszórva nátronmeszet és  $Cu SO_4$ -os habkődarabkákat, az aljában pedig koncentrált szublimát-oldatot tartalmazott) keresztül gummicső segítségével a lombik tartalmából annyit szívunk fel a toldalékesőbe, hogy az körülbelül a *c* jelig érjen, ezután az *a* csapot elzárjuk (2. ábra II.) s az *a* csap



2. ábra.

felett álló folyadékból (miután a *d* csövecskét gázlánggal sterilizáltuk) az *a* csapnak a 2. ábra III-ban feltüntetett helyzetbe való lassú elcsavarásával a baktériológiai vizsgálathoz szükséges bizonyos számú cseppet a *d* csövecskén leengedjük. Mintavétel után a felszívott folyadékot visszabocsátjuk a lombikba, a toldalékesővön 1—2 perczig steril és  $CO_2$ -tól mentes levegőt hajtunk át (csapok helyzete 2. ábra I.) s aztán mindkét csapot elzárjuk (2. ábra IV.)

A lombikon átszívott levegő, mielőtt a lombikba jutott volna, két mosópalaczkon, és három szárítótornyon áramlott át, a melyek balról jobbra haladva, a következő anyagokkal voltak megtöltve. I. Bruns-gyapot; II. koncentrált szublimátoldat; III. koncentrált káliulúgdat; IV. darabos nátronmész; V. toluollal megnedvesített Bruns-gyapot.

Az utolsó szárítótornyos gondosan sterilizált s üveglapokkal

védett spirálcsővel (*B*) volt összekötve, mely spirálcső a lombikkal együtt a kísérlet tartama alatt 37 C°-os vízfürdőben állott.<sup>1</sup>

A lombik kivezető csövét jeges vízzel hűtött 30 cm hosszú ALLIHN-féle hűtő alkotta, melynek felső vége  $\Gamma$  alakú csőben folytatódott s ez utóbbinak alsó vége  $\text{Cu SO}_4$ -os habkődarabakkal töltött U csővel, majd négy nagyobb fajta  $\text{Ca Cl}_2$ -os U csővel s végül 15 literes aszpirátorral állott összeköttetésben. A második és harmadik  $\text{Ca Cl}_2$ -os cső közé volt iktatva a lombikból eltávozó  $\text{CO}_2$  elnyelésére szolgáló GEISSLER-WETZEL-féle kálikészülék.

A kísérlet végrehajtására vonatkozólag STOKLASA eredeti közleményeire utalok, a keletkezett vegyületek kimutatását és meghatározását illetve pedig a következőket kívánom megemlíteni.

Az *alkohol* kvalitatív kimutatására az A. MÜNTZ<sup>2</sup> és M. BERTHELOT-féle<sup>3</sup> reakciókat használtam, az utóbbi reakció a MÜNTZ-féle reakciónak az ellenőrzésére szolgált. Az alkohol mennyiségi meghatározását a REISCHAUER-AUBRY-féle piknométerrel W. PALLADIN<sup>4</sup> előírása szerint végeztem.

A  $\text{CO}_2$ -nak az I. táblázatban feltüntetett mennyisége a kálikészülék súlyszaporulatából s a kísérleti oldatban elnyelt szénsav mennyiségéből adódott ki. A  $\text{Cu SO}_4$ -os s az utána következő két  $\text{Ca Cl}_2$ -os csőben a kísérlet befejezése után visszamaradt kevés szénsavat is áthajtottam a kálikészülékbe. A kísérleti oldatban elnyelt szénsav meghatározására a FRESSENIUS-CLASSEN-féle<sup>5</sup> eljárást használtam.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> E spirális cső azt a célt szolgálta, hogy a lombikba bejutó levegő már 37 C°-ú legyen.

<sup>2</sup> A. MÜNTZ, Comptes rendus. 73. (1871.) 496.

<sup>3</sup> M. BERTHELOT, Ann. de chim. et de phys. 13. (1878.) 543.

<sup>4</sup> E. ABDERHALDEN, Handbuch d. biochem. Arbeitsmeth. III. 1. (1910.) 509. Berlin-Wien.

<sup>5</sup> A. CLASSEN, Ausgewählte Methoden der analytischen Chemie, II. Band (1903.) 653. Braunschweig.

<sup>6</sup> A kálikészülék lemérése után minden esetben meghatároztam az abban levő lúg által elnyelt eczetsavat is s azt levontam a  $\text{CO}_2$  mennyiségéből s hozzáadtam az eczetsavnak a talált mennyiségéhez.

A tejsav jelenlétét az alkohol ledesztillálása után visszamaradt folyadékban az UFFELMANN-féle<sup>1</sup> reagenssel s a tejsavas kalciumból oxidáció ( $KMnO_4$ ) útján nyert acetaldehid, illetve jodoform kimutatásával állapítottam meg. A tejsav mennyiségi meghatározását a foszforsavval erősen megsavanyított oldatból éterral kioldott, majd lúggal közönbösített készítményben A. PARTHEIL<sup>2</sup> eljárása szerint végeztem.

Az eczetsavat a kénsavval megsavanyított oldatból vízgőzzel desztilláltam le s a nyert párlatban  $Fe_2Cl_6$ -dal s a kakodilreakcióval<sup>3</sup> mutattam ki, mennyiségi meghatározását pedig tényleges úton (használt indikátor fenoltalein volt) végeztem. Az eczetsav mellett nyomokban bizonyára jelenlevő homologsavakat, mint eczetsavat vettem számításba.

II. táblázat.

Sorszám	Az enzim előállításához használt növényi szerv	A növényi szén egészségi állapota	A meghatározás időtartama	$CO_2$ g	Alkohol g	Tejsav g	Ecetsav g	$C_2H_6O : CO_2$
1	Burgonyagumó	egészséges	60óra	0·426	0·449	0·181	0·042	105·4
2	«	«	60 «	0·293	0·306	0·106	0·061	104·4
3	«	beteg	60 «	0·315	—	—	0·292	—
4	Czukorrépagyökér	egészséges	60 «	0·576	0·581	0·198	0·098	100·8
5	«	«	60 «	0·612	0·619	—	—	101·1
6	Burgonyagumó	egészséges	60 «	0·381	0·351	0·092	—	92·1
7	«	beteg	60 «	0·406	jól kimutatható	—	0·207	—
8	«	egészséges	64 «	0·182	0·189	0·058	0·021	103·8
9	Czukorrépagyökér	beteg	60 «	0·197	0·058	0·042	0·042	29·4
10	«	egészséges	60 «	0·220	0·261	—	0·057	118·6
11	«	«	60 «	0·518	0·548	0·123	—	105·7

<sup>1</sup> E. SCHMIDT, Ausführliches Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie, V. Aufl. II. Band (1910.) 549. Braunschweig.

<sup>2</sup> A. PARTHEIL, Arch. d. Pharm. (1903.) 432.

<sup>3</sup> E. SCHMIDT, Ausführliches Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie, V. Aufl. II. Band (1910.) 395. Braunschweig.

Mindenik meghatározáshoz a poralakú nyers enzimből 10 g-ot, a 15%-os glükózoldatból 100 cm<sup>3</sup>-t használtam, mely utóbbi 1% K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-ot is tartalmazott. A II. táblázaton feltüntetett adatok 10—10 g. nyers enzimre vonatkoznak. A glükózoldat készítéséhez vett desztillált vizet először sterilizáltam s aztán toluollal telítettem, a használt antiszeptikum ugyancsak toluol volt, minden esetben 2%-os mennyiségben. A mi az erjedési folyamat megindulását illeti, azt az oldat habzásából mindjárt a kísérlet kezdetén meg lehetett állapítani.

Megemlítem még, hogy e vizsgálatokhoz használt burgonya-gumók teljesen nyugalmi állapotban voltak s az egyes minták több fajtának a keverékéből állottak. A cukorrépa ősszel a földből kiszedett, tehát egészen kifejlett példányok voltak.

III. táblázat.

Sorszám	Vizsgálat baktériumokra								Megjegyzés	
	A meghatározás kezdetétől a mintavételig eltelt idő órákban									
	0·5	2	5	10	20	30	50	60		
1	negatív								—	
2	negatív								—	
3	—	pozitív								penészgombák is jelen voltak
4	—	—	+	+	+	—	—	—	—	
5	negatív								—	
6	—	+	+	+	+	—?	+	+	—	
7	pozitív								—	
8	negatív								60 óra helyett 64 óra veendő	
9	—	pozitív								—
10	negatív								—	
11	negatív								—	

E két táblázat adataiból legelső sorban is az *egészséges* növényi szerveket illetőleg a következők olvashatók ki.

A burgonya és cukorrépa raktározó szervéből izolált nyers enzim a glükózoldatra oly módon hatott, hogy tejsav és kevés

eczetsav mellett keletkező alkohol és szénsav viszonylagos mennyisége minden esetben igen közel esett az alkoholos erjedést jellemző  $104\cdot5$  ( $CO_2=100$ ) arányhoz. Baktériumok jelenlétét az erjedő folyadékban, dacára a jelenlevő 2% toluolnak, két esetben (4 és 6) lehetett kimutatni, a többi esetben (1, 2, 5, 8, 10, 11) a vizsgálati folyadék mentes volt baktériumoktól. A baktériumok jelenléte a kérdés lényegét illetve csakis abból a szempontból bír fontossággal, hogy milyen mértékben, vagy pedig egyáltalában képesek-e azok a glükózoldatra az alkoholos erjedést jellemző módon hatni.

E kérdés eldöntésére a vizsgálati folyadékban talált baktériumokat bouillonban tenyésztettem s miután abban a kellő mennyiségben elszaporodtak ( $1\text{ cm}^3$  12.600 baktériumot tartalmazott), forralással inaktivált nyers enzim (10 g) s glükózoldat ( $100\text{ cm}^3$ ) elegyéhez  $10\text{ cm}^3$ -t adtam a bouillontenyészetből s a vizsgálatot a már ismert módon végeztem. A 60 óráig tartó kísérlet eredményeként 95 mg. szénsav keletkezett s alkoholnak nyomait sem találtam a vizsgálati folyadékban.

*Ezek alapján végérvényesen kimondhatjuk, hogy a burgonya és cukorrépa raktározó szervéből a zimáz szilárd aktív állapotban izolálható s így STOKLASA ide vonatkozó észleletei saját vizsgálataim alapján is megerősítést nyertek.*

Lássuk ezután, hogy a beteg növényi szervekből előállított enzimek mi módon hatottak a glükózoldatra.

A 3. számú, gyűrűsbetegségben<sup>1</sup> szenvedő burgonyagumó

---

<sup>1</sup> A burgonyának ez a betegsége (O. APPEL foglalkozott vele legelőször szakszerűen [Kaiserliche Biologische Anstalt für Land- und Forstwirtschaft, Flugblatt Nr. 36.]) a gumón, ha azt (mint jelen esetben is) erősebb fokban támadta meg, abban mutatkozik, hogy a kétfelé vágott gumón a héjtól befelé, a héj körvonalával párhuzamosan haladó barnás-fekete gyűrűs színeződés észlelhető, a mely színeződés az edénynyalábokat kitöltő baktériumoktól származik. A gyűrűsbetegséget okozó baktériumok korhadási baktériumok, de másodlagosan társulhatnak hozzájuk rothadást előidéző baktériumok is s ez esetben aztán a gyűrűsbeteg gumó belülről kifelé haladó elrothadását észlelhetjük. A gyűrűsbeteg burgonyában található baktériumok a talajból kerülnek a gumóba s a talaj változó baktériumflorája szerint különbözők lehetnek; és így ha egy baktériumfaj megtalálható

esetében alkohol jelenlétét egyáltalában nem sikerült a vizsgálati folyadékban kimutatni, azonban eczetsav jóval nagyobb mennyiségben keletkezett, mint az egészséges gumókból előállított nyers enzimeknél és baktériumokat nagy számban lehetett találni az erjedő folyadékban. Jelen esetben előbb anaërob (*N* légkörben), majd aërob viszonyok között eltartott eredeti gyűrűsbeteg gumóban is jelentékenyebb mennyiségű eczetsavat lehetett kimutatni s így nagyon valószínű (minthogy az alkoholoxidáz BUCHNER és GAUNT<sup>1</sup> vizsgálatai alapján a sejtekből nem izolálható), hogy a baktériumok — tekintettel az enzim kiválasztására használt eljárásra — spóráik alakjában a gyűrűsbeteg gumóból (s nem a környezetből) kerültek a kiválasztott enzimbe, majd pedig ebből a glükózoldatba, a hol aztán — dacára a jelenlevő antiszeptikumnak<sup>2</sup> — elszaporodtak s a talajbaktériumok körében is elterjedt alkoholorxidázzal a glükózoldatból a zimáz hatására keletkezett alkoholt mindjárt eczetsavvá oxidálták.

Az erjedő folyadékban talált baktériumoknak az alkoholt eczetsavvá oxidáló képességüket BELJERINCK<sup>3</sup> eljárása szerint a kalciumkarbonátot s etilalkoholt tartalmazó sörzselatinon való tenyésztéssel is ki lehetett mutatni, s hasonló sajátsággal bíró baktériumok jelenlétét magából az eredeti gyűrűsbeteg gumóból közvetlenül nyert tenyészetekben is sikerült megállapítani.

Hasonló az eset a 7. sz. gyűrűsbeteg burgonyánál is, azzal a különbséggel, hogy itt alkohol jelenlétét is sikerült kimutatni, tehát nem az összes alkohol oxidálódott eczetsavvá.

valamely gyűrűsbeteg gumóban, nem következik, hogy például más vidékről származó beteg gumóban szintén megtalálható.

E betegségről részletesen olvashatni a m. kir. növényélet- és kórtani állomás kiadásában dr. BUDAHÁZY IMRE tollából megjelenő «Burgonya-betegségek» című munkában, a mely mű a szerző saját megfigyeléseinek kívül az irodalmi adatok igen gondos felhasználásával készült.

<sup>1</sup> L. ASHER u. K. SPIRO, *Ergebnisse d. Physiologie*, 12. (1912.) 191. Wiesbaden.

<sup>2</sup> «In Gegenwart von Toluol oxydieren die Essigbakterien Alkohol viel energischer als die Acetonpräparate.» *l. c.*

<sup>3</sup> E. ABDERHALDEN, *Handbuch d. biochem. Arbeitsmeth.* III. 2. (1910.) 1265. Berlin-Wien.

A 9. sz. cukorrépa a gyökérfarkrothadás<sup>1</sup> nevű betegségben szenvedett. E répából előállított nyers enzim hatására a glükózoldatból a várt mennyiségnél jóval kevesebb alkohol keletkezett. A hiányzó alkohol nem alakulhatott át eczetsavvá, mert annak mennyisége e gyökérfarkrothadásos cukorrépánál nem haladja túl az egészséges cukorrépánál talált legnagyobb eczetsav mennyiséget; baktériumok jelenlétét az erjedő folyadékban ki lehetett mutatni. További vizsgálatoknak a feladata eldönteni, hogy vajjon a keletkezett alkohol átalakulása, vagy pedig valamilyen az alkoholos erjedéssel párhuzamosan lefolyó s  $CO_2$ -ot termelő folyamat okozta-e ezt a fentebbi jelenséget.

★

A burgonya és a cukorrépa raktározó szervéből előállított nyers enzimben a karboxiláz kimutatására ugyanazt a kísérleti berendezést használtam, mint a zimáz vizsgálatakor, azzal a különbséggel, hogy glükózoldat helyett a nyers enzimnek 1%-os piroszőlősavoldatra gyakorolt hatását vizsgáltam s nem  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on, hanem szobahőmérséken végeztem a kísérletet.

Hogy a burgonya és a cukorrépa nyers enzímje a piroszőlősavra elbontólag hatott, azt mindjárt a kísérlet kezdetén meginduló gázfejlődés mutatta, a mely gáz  $CO_2$ -nak bizonyult, továbbá az A lombik tartalmából ledesztillált folyadékban a RIMINI-féle<sup>2</sup> reakcióval (nitroprusszidnátrium + piperidin) az acetaldehid jelenlétét jól ki lehetett mutatni.

*Ezek alapján az élesztőgombák zimázához hasonlóan a burgonya és a cukorrépa zimáz-rendszerében is jelen van a NEUBERG-féle karboxiláz.*

Az alábbi táblázat 10—10 g. nyers enzimben foglalt karboxiláz hatására  $100\text{—}100\text{ cm}^3$  1%-os piroszőlősavoldatból keletkező termékek mennyiségét tünteti fel. Az acetaldehid meg-

<sup>1</sup> E betegségről l. szerzőnek «A cukorrépa gyökérfarkrothadásának biokémiai tanulmányozása» című dolgozatát. Kísérl. Közl. 18. (1915.) 73. és Biochem. Zeitschr. 69. (1915.) 245.

<sup>2</sup> J. WOHLGEMUTH, Grundriss der Fermentmethoden (1913.) 96. Berlin.

határozása végett a párlathoz eczetsavas *p*-nitrophenilhidrazinoldatot adtam, a kiváló kristályos csapadékot egy órai állás után Gooch-tégelyen leszűrtem és 90 C°-on kiszáritva mértem.

## IV. táblázat.

Sorszám	Az enzim előállításához használt növényi szerv	A meghatározás időtartama	CO <sub>2</sub> g	Acet- aldehid g
1	Burgonyagumó	48 óra	0·208	0·185
2	„ „	60 „	0·242	0·198
3	Czukorrépagyökér	48 „	0·181	0·169
4	„ „	60 „	0·214	0·199

NEUBERG és munkatársai a karboxiláznak, mint a zimáz-enzimrendszer egyik tagjának, több olyan sajátosságát állapították meg, a melyek megkülönböztetik a karboxilázt a zimáz többi enziméitől. Bizonyos külső behatások a zimáz amaz enzimeinek a működését befolyásolják károsan, a melyek a három szénatomú vegyületeket készítik a czukorból; ellenben a C<sub>3</sub>-mal bíró piro-szőlősavnak az elbomlása a külső behatásra kevésbé reagáló karboxiláz hatására zavartalanul történik.

A zimáz és karboxiláz között külső behatásokra létrejövő különbségek közül itt csak azokkal foglalkozom, a melyek saját kutatásaim alapján a burgonya és czukorrépa zimázában levő karboxilázra is érvényesek.

## I.

Az élesztőgombákból BUCHNER vagy LEBEDEW eljárása szerint készült lében (Press-Saft, Macerationssaft) a zimázhatás a lé eltartásakor 1—2 nap alatt eltűnik, az ilyen lé a glükózoldatot már nem tudja többé elerjeszteni. Ha a glükózoldattal már nem reagáló lével C. NEUBERG piro-szőlősavra hatott, csaknem oly erős CO<sub>2</sub>-fejlődést észlelt, mintha friss állapotban levő — tehát még aktiv zimázt tartalmazó — lével végezte volna a kísérletet. Ez a különbség a zimáz és karboxiláz között

NEUBERG<sup>1</sup> szerint a koenzimnek a léből az eltartás ideje alatt végbemenő eltünésére volna visszavezethető, a mely koenzim csakis a zimáz (vagy helyesebben [zimáz – karboxiláz] enzimek) működéséhez szükséges, a karboxiláz koenzim segítségével nélkül is tudja a hatását kifejteni.

STOKLASA a magasabb rendű növényekből előállított szilárd nyers enzimeken is azt észlelte, hogy azok 14 napi eltartás után már nem hatottak a glükózoldatra; kérdés már most, vajjon tudják-e még az ilyen — hosszabb ideig eltartott — burgonya és cukorrépa nyers enzimek a piroszőlősavat elbontani.

E kérdés eldöntésére a burgonya és cukorrépa nyers enzimeit két hétig tartottam steril exszikkátorban, a mely idő eltelte után a glükóz- és piroszőlősavoldatokra való hatásuknak a vizsgálatok az alábbi táblázaton feltüntetett 10—10 g. nyers enzimre vonatkozó adatokat nyertem.

V. táblázat.

Sorszám	Az enzim előállításához használt növényi szerv	A meghatározás időtartama	100 cm <sup>3</sup> 10%-os glükózoldatból CO <sub>2</sub> g	100 cm <sup>3</sup> 10%-os piroszőlősavoldatból CO <sub>2</sub> g
1	Cukorrépagyökér	48 óra	0·006	0·140
2	Burgonyagumó	51 "	0·011	0·105
3	" "	48 "	0·003	0·208
4	" "	48 "	0·004	0·082

E táblázat adataiból láthatjuk, hogy a burgonya és cukorrépa zimázának és karboxilázának az érzékenysége az eltartási idő iránt az élesztőgombák zimázához, illetve karboxilázához hasonló viszonyokat tüntet fel.

<sup>1</sup> C. NEUBERG és P. ROSENTHAL, Biochem. Zeitschr. 51. (1913.) 137.; 61. (1914.) 172. Különlenyomatok.

## II.

C. NEUBERG és N. IVANOFF<sup>1</sup> azt találta, hogy a LEBEDEW-féle maczerációs-lé bizonyos anorganikus és organikus anti-szeptikumok (nátriumfluorid, merkuriklorid, formaldehid, fenol, timol) hozzáadása után a nádezzukor- vagy glükózoldatot már nem erjesztette el, ellenben a piroszölösavat a karboxilázt jellemző módon még elbontotta, a miből az következik, hogy a karboxiláz bizonyos mérgek iránt jóval kevésbé érzékeny, mint a zimáznak a többi enzíme. Ezzel az eljárással NEUBERG szerint igen egyszerű módon demonstrálható a karboxiláz működése cukor jelenlétében is, a mint azt saját észleleteim is bizonyítják, a melyeknek eredményeit — bár ha azok szorosan véve nem tartoznak ide — érdemesnek tartom az alábbiakban egészen röviden felemlíteni.

<i>a</i>	<i>b</i>
10 cm <sup>3</sup> Lebedew-f. lé	10 cm <sup>3</sup> Lebedew-f. lé
5 „ 2·5%-os glükózoldat	5 „ 2·5%-os piroszölösavoldat
10 „ dest. víz	10 „ dest. víz
<i>c</i>	<i>d</i>
10 cm <sup>3</sup> Lebedew-f. lé	10 cm <sup>3</sup> Lebedew-f. lé
5 „ 2·5%-os piroszölösavoldat	5 „ 2·5%-os glükózoldat
5 „ 2·5%-os glükózoldat	1 „ 1 %-os HgCl <sub>2</sub> -oldat
5 „ dest. víz	9 „ dest. víz
<i>e</i>	<i>f</i>
10 cm <sup>3</sup> Lebedew-f. lé	10 cm <sup>3</sup> Lebedew-f. lé
5 „ 2·5%-os piroszölösavoldat	5 „ 2·5%-os glükózoldat
1 „ 1 %-os HgCl <sub>2</sub> -oldat	5 „ 2·5%-os piroszölösavoldat
9 „ dest. víz	1 „ 1 %-os HgCl <sub>2</sub> -oldat
	4 „ dest. víz

24 óra után keletkezett

	CO <sub>2</sub> cm <sup>3</sup>
<i>a</i> .....	4·8
<i>b</i> .....	5·3
<i>c</i> .....	14·8
<i>d</i> .....	0·3 ?
<i>e</i> .....	3·2
<i>f</i> .....	3·6

<sup>1</sup> C. NEUBERG és N. IVANOFF, Biochem. Zeitschr. 67. (1914.) 1. Különlenyomat.

A *c* alatti adatok megerősítik M. OPPENHEIMER<sup>1</sup> ama észleletét, hogy a piroszőlősav jelenléte aktiválólag hat az alkoholos erjedésre; a piroszőlősav és glükóz együttes erjedésekor 4·7 cm<sup>3</sup>-rel több CO<sub>2</sub> keletkezett, mint a mikor azok külön-külön (*a* és *b*) erjedtek. A *d* kísérletben a glükóz erjedése a Hg Cl<sub>2</sub> erős mérgező hatása folytán nem indulhatott meg (0·3 cm<sup>3</sup> egyáltalában nem jöhet tekintetbe). Végül az *f* alatti adatokból látható, hogy a karboxiláznak a piroszőlősavra való hatása glükóz jelenlétében is vizsgálható, feltéve, hogy egyidejűleg Hg Cl<sub>2</sub>-ot is tartalmaz az oldat; a Hg Cl<sub>2</sub> meggátolta a glükóznak az erjedését s így a piroszőlősavnak az alkoholos erjedést aktiváló tulajdonsága sem érvényesülhetett.

A burgonya és czukorrépa karboxiláznak a viselkedését nátriumfluorid, merkuriklorid és formaldehyd antiszeptikumokkal szemben az alábbi táblázat adatai tüntetik fel.

VI. táblázat.

Sorszám	Az enzim előállításához használt növényi szerv <sup>2</sup>	A meghatározás időtartama	100 cm <sup>3</sup> 10%-os glükóz-oldatból CO <sub>2</sub> g	100 cm <sup>3</sup> 1%-os piroszőlősavold.-ból CO <sub>2</sub> g	Az antiszeptikum koncentrációja
1	Burgonyagumó	60 óra	0·623	0·211	—
2	„	60 „	0·006	0·109	0·05% HgCl <sub>2</sub>
3	„	60 „	0·002	0·128	1·00% NaF
4	„	60 „	0·004	0·096	0·50% HCOH
5	Czukorrépagyökér	60 „	0·318	0·177	—
6	„	60 „	0·002	0·091	0·05% HgCl <sub>2</sub>
7	„	60 „	0·028 ?	0·140	1·00% NaF
8	„	60 „	0·003	0·102	0·50% HCOH

<sup>1</sup> M. OPPENHEIMER, Zeitschr. f. physiol. Chem. 93. (1914.) 235. Különlenyomat.

<sup>2</sup> Az enzim mennyisége minden esetben — valamint a VII. táblázatban is — 10 g volt.

## III.

Ha a LEBEDEW-féle maczerációs-levet vízfürdön 10—15 perczig 50—51 C°-on melegítjük és a zavaros oldatot megszűrjük, a szűrlet — a mint azt C. NEUBERG és P. ROSENTHAL megfigyelte — a glükózoldatra hatástalan, ellenben a piroszőlősavat még egészen erélyesen elbontja. Ez az észlelet bizonyítja a karboxiláznak jóval kevésbé érzékeny természetét — jelen esetben a magasabb hőmérséklet iránt —, szemben a zimáznak a többi enzimével.

Annak megvizsgálására, hogy a burgonya és cukorrépa karboxiláza mennyiben bír hasonló természettel, a burgonyagumó és cukorrépagyökér kipréselt nedvét vízfürdön 51 C°-on 15—20 perczig melegítettem s a leszűrt folyadékból a már ismertett eljárással választottam le a nyers enzimet s vizsgáltam a glükóz- és piroszőlősavoldatokra kifejtett hatását.

VII. táblázat.

Sorszám	Az enzim előállításához használt növényi szerv	A meghatózás időtartama	100 cm <sup>3</sup> 10%-os glükózoldatból CO <sub>2</sub> g	100 cm <sup>3</sup> 1% os piroszőlősavoldatból CO <sub>2</sub> g
1	Cukorrépagyökér	48 óra	0·008	0·242
2	Burgonyagumó	48 "	0·007	0·196
3	"	48 "	0·004	0·198

A nyert eredmények bizonyítják, hogy a burgonya és cukorrépa karboxiláza is jóval kevésbé érzékeny a magasabb hőmérséklettel szemben, mint e növények zimázanak többi enzime.

## Összefoglalás.

1. A burgonya és a cukorrépa raktározó szervéből a zimáz szilárd aktív állapotban izolálható s így J. STOKLASA ide vonatkozó észleletei saját vizsgálataim alapján is megerősítést nyertek.

2. Az erjedő folyadékban, ha előfordultak is némely esetben baktériumok, azok nem bírtak azzal a tulajdonsággal, hogy 2% toluol jelenlétében a glükózt az alkoholos erjedést jellemző módon bontsák el.

3. Gyűrűsbeteg burgonyagumókból előállított nyers enzim oly módon hatott a glükózoldatra, hogy alkoholt egyáltalában nem, vagy csak nyomokban sikerült az erjedő folyadékban kimutatni, helyette nagyobb mennyiségű eczetsav megjelenését lehetett észlelni; ezt az eczetsav-többletet alkohoxidázt termelő talajbaktériumok készítették a zimáz hatására keletkező alkoholból. A talajbaktériumok a gyűrűsbeteg gumókból spóráik alakjában kerültek a nyers enzimbe.

4. A gyökérfarkrothadásos cukorrépa-kból kapott nyers enzim hatására keletkező alkohol és szénsav viszonylagos mennyisége jóval kisebb volt, mint az alkoholos erjedésnél; e jelenség megfejtése eldöntetlen maradt.

5. Az élesztőgombák zimázához hasonlóan a burgonya és cukorrépa zimáz-rendszerében is jelen van a NEUBERG-féle karboxiláz.

6. A karboxiláz a burgonya és cukorrépa zimázából is kiválasztható, mert sikerült oly készítményt előállítani, a mely csakis a piroszólósavra hatott, a cukoroldatot változatlanul hagyta.

7. Az eltartási idő, valamint a különböző antiszeptikumok iránt a burgonya és cukorrépa karboxiláza — hasonlóan az élesztőgombák karboxilázához — jóval kevésbé érzékeny, mint a zimáz-rendszer többi enzime.

---

(A M. T. Akadémia III. osztályának 1915 márczius 15.-én tartott üléséből.)

