

Umwandlung des Zuckers und Bildung der Kohlensäure bei der alkoholischen Gärung.

Von

Hans Euler und David Johansson.

Mit einer Kurvenzeichnung im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.
Der Redaktion zugegangen am 30. November 1911.)

Die Hydrolyse von Maltose durch lebende Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt ziemlich langsam, wenig oder nicht schneller als die Vergärung, und (in 8%iger Lösung) etwa 100—200mal langsamer als die Inversion des Rohrzuckers.¹⁾ Daß überhaupt stets eine Hydrolyse der Maltose eintritt, behauptet E. Fischer auf Grund zahlreicher eigener Versuche. In Gegenwart von Giften verläuft die Maltosespaltung ziemlich unregelmäßig, Chloroform hemmt dieselbe, andere Antiseptika wirken ungleich auf die Spaltung der Maltose und des α -Methylglukosides. Diese Unregelmässigkeiten werden im hiesigen Laboratorium näher untersucht, und es soll deswegen hier nicht näher auf sie eingegangen werden.

Fest steht jedenfalls folgendes: Während es leicht gelingt, die Inversion des Rohrzuckers neben der Vergärung dieses Zuckers zu messen, ist die entsprechende Aufgabe bei der Maltase der Bierhefe oft mit großen Schwierigkeiten verknüpft, sofern sie überhaupt lösbar ist. Es dürfte dies daher rühren, daß die Maltase, in den meisten Bierhefen wenigstens, fast vollständig mit dem Protoplasma verbunden ist. Es war anzunehmen, daß Maltase mit den Gärungsenzymen etwa in derselben Weise zusammenwirkt, wie diese letzteren Enzyme untereinander. Es lag deswegen auch nahe, die gleichen Methoden zu ihrer Trennung und zu ihrem Nachweis zu versuchen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 85, 1911.

Das Auftreten von Glukose bei der Vergärung von Maltose hat E. Fischer untersucht, indem er das Gemisch von Glukosazon und Maltosazon mit Wasser auskochte und das zurückbleibende Glukosazon wog. Wie Fischer selbst betont, ist diese Methode nicht quantitativ. In Abwesenheit anderer Zucker erscheint es am einfachsten, an einer Maltoselösung, sowohl den Kohlensäureverlust als den Rückgang der optischen Drehung zu messen und aus letzterem Wert unter Berücksichtigung des vergorenen Zuckers die Menge hydrolysierter Maltose zu berechnen. Indessen stört hier gerade ein Umstand, welcher auf dem Zusammenwirken mehrerer Hefenenzyme beruht. Die entwickelte Kohlensäure entspricht nicht dem Drehungsrückgang, welchen die Lösung erleidet.

Eine solche Differenz ist bei der zellfreien Gärung näher studiert worden; sie wird auf Grund der unten erwähnten Versuche von Harden und Young, sowie von Buchner und Meisenheimer als die Folge einer enzymatischen Reversion angesehen. Andererseits liegt die Annahme nahe, daß es sich hier um das Auftreten eines optisch-inaktiven oder schwach aktiven Zwischenproduktes handelt.

Wir sind diesem Problem der Gärung näher getreten in Rücksicht auf die vor längerer Zeit im hiesigen Laboratorium begonnenen Untersuchungen über Enzyymbildung. Man hat nämlich bei Untersuchungen über die Wirksamkeit der Hefe bei sehr gründlichen experimentellen Arbeiten von der Gärkraft der Hefe ohne genügenden Grund direkt auf ihren Zymasegehalt geschlossen. Ein eingehenderes Verständnis der Veränderungen, welche die Hefe unter der Einwirkung äußerer Einflüsse erleidet, läßt sich aber nur gewinnen durch Verfolgung der einzelnen Teilvorgänge. Daß die enzymatische Zuckerspaltung in mehreren Phasen und durch Vermittlung von Zwischenprodukten verläuft, kann nach den Untersuchungen von Buchner und Meisenheimer, Harden und Young, Iwanoff und v. Lebedew, durch welche ein umfangreiches experimentelles Material beigebracht worden ist, nicht mehr zweifelhaft sein.

Bezüglich der bei der Gärung der lebenden Hefe auftretenden Differenz zwischen verschwundenem Zucker und ent-

wickelter Kohlensäure haben wir nur eine ganz kurze Angabe von Jodlbauer¹⁾ gefunden, welche uns leider nur im Referat zugänglich war.

Dagegen sind solche Differenzen bei der zellfreien Gärung durch Hefepreßsaft mehrfach beobachtet worden. Zuerst haben wohl A. Macfadyen, Harris Morris und S. Rowland²⁾ auf das Auftreten einer solchen Differenz hingewiesen. Sie schreiben:

«Wir unterwarfen auch das nach der Gärung hinterbleibende Produkt der Spaltung mit sehr verdünnter Säure in der Absicht, irgend welche hydrolysierbare Verbindung, die aus den Bestandteilen des Preßsaftes und dem verschwundenen Betrage an Zucker hätte entstehen können, wieder zu spalten, erhielten aber kein Resultat. Die reduzierende Kraft vor und nach der Behandlung mit Säure bleibt die gleiche. Der Zucker ist deshalb anscheinend als solcher verschwunden und nicht lediglich durch die gewöhnlichen Reagenzien nachweisbar geworden.

Die späteren, eingehenden Versuche anderer Forscher haben das entgegengesetzte Resultat geliefert.

Harden und Young³⁾ fanden, daß ein Teil des Zuckers in eine Substanz übergeht, welche Fehlings Lösung nicht mehr direkt, wohl aber nach der Hydrolyse mit Salzsäure reduziert. «Die Entstehung dieses Körpers» schreiben Buchner und Meisenheimer⁴⁾ bei der Besprechung dieser Arbeit «kann allem nach nur auf die Wirksamkeit eines im Preßsaft vorhandenen aufbauenden Enzymes zurückzuführen sein.

Auf die Möglichkeit des Vorhandenseins eines revertierenden Enzymes im Hefepreßsaft hat schon früher E. Buchner hingewiesen zur Erklärung der Angaben von M. Cremer,⁵⁾ welcher in mit Fruktose versetztem Hefepreßsaft Neubildung von Glykogen nachgewiesen haben will.

¹⁾ Zeitschrift für Rübenzuckerindustrie. Bd. 25. S. 308, 1888. — Chem. Zentralbl., Bd. 19, S. 769, 1888.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 33, S. 2786, 1900.

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 37, S. 1067, 1904.

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 39, S. 3205, 1906.

⁵⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 32. S. 2062, 1899.

Buchner und Meisenheimer haben die Versuche von Harden und Young wiederholt und zwar mit ziemlich genau demselben Resultat. Durch ihre Versuche haben sie «den Nachweis eines aufbauenden Enzymes im Preßsaft aus untergäriger Hefe zahlenmäßig festgelegt».

Mit Dauerhefe hat später A. v. Lebedew¹⁾ nachgewiesen, daß bei Gegenwart von Phosphaten die entwickelte Kohlensäure nicht dem verschwundenen Zucker, welcher durch Titration bestimmt wurde, entspricht. «Die Differenz der beiden Werte zeigt offenbar, daß in der Lösung ein Produkt vorhanden ist, das nicht mehr ursprünglicher Zucker ist, aber auch noch in Kohlensäure und Alkohol zersetzt wird. Dieses Produkt ist eben die Zwischenverbindung, nämlich der Ester, der ein kleineres Reduktionsvermögen als Zucker hat.

Ist nun in der Lösung die Hälfte des Zuckers vergoren, so sind ca. 20% der ursprünglichen Zuckermenge, scheinbar nach dem Reduktionsvermögen berechnet, verschwunden, ohne die entsprechende Menge der Kohlensäure und des Alkohols zu liefern.»

v. Lebedew sieht also das entstehende Zwischenprodukt als Hexosephosphorsäureester an.

Kennt man das Reduktionsvermögen des Esters genau, so läßt sich berechnen, wieviel Hexosephosphorsäureester in jedem Augenblick in der Lösung vorhanden ist, unter der Voraussetzung, daß derselbe die ganze Differenz veranlaßt.

Wir haben bis jetzt darüber selbst keine Erfahrung,²⁾ ebensowenig darüber, ob beim Arbeiten mit Hefepreßsaft wirklich ein höheres Kohlenhydrat gebildet wird. Wir wollen deswegen die diesbezüglichen Arbeiten auch hier nicht diskutieren.

Unsere hier mitzuteilenden Versuche sind ausschließlich mit lebender Hefe angestellt (Hefe H der hiesigen St. Eriksbrauerei); als Zucker kam Glukose «Kahlbaum» zur Anwendung und die Gärung ging ohne Phosphat vor sich.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 28, S. 227, 1910. Vgl. auch die Anmerkung Biochem. Zeitschr., Bd. 10, S. 456, 1908.

²⁾ Die diesbezüglichen Versuche mit Trockenhefe und Phosphaten anzuführen, hat sich v. Lebedew vorbehalten.

Die Bestimmung der entwickelten Kohlensäure geschah bei einigen Versuchen (Nr. 1 und 2) volumetrisch, bei den meisten durch Wägung. Die Lösungen befanden sich in Erlenmeyer-Kölbchen, welche durch Meißl-Ventile verschlossen waren. Bei Beginn des Versuchs und vor jeder Wägung wurde das Kölbchen unter gelindem Schütteln evakuiert, um die Kohlensäure aus der Lösung und der darüber befindlichen Luft zu entfernen: unmittelbar darauf wurde Luft eingelassen und die Wägung ausgeführt.

Die Ergebnisse unserer Versuche sind in den folgenden Tabellen enthalten. Die Tabelle A enthält die Vorversuche, welche zur Orientierung angestellt wurden, und zwar mit verschiedenen Hefen. In dieser Tabelle sind nur die mit der gleichen Nummer versehenen Versuche miteinander vergleichbar.

Tabelle A.

Nr.	Temp. ° C.	Hefemenge in 25 ccm Lösung	°/o Trocken- substanz	Zeit in Min.	Entwickelte CO ₂		Drehungsänderung		Diff.
					g	°/o	in Graden	°/o	
35	10	1	34	188	0,0345	3,4	4,30—3,77=0,53	12,3	8,9
36	10	1	34	186	0,0398	4,0	4,30—3,77=0,53	12,3	8,3
40	10	1	34	—	0,1570	15,8	4,27—3,20=1,07	25,0	9,2
43	10	1	34	292	0,0988	10,0	4,27—3,50=0,77	18,1	8,1
43	10	1	34	304	0,0587	6,0	4,40—3,67=0,63	14,3	8,3
44	10	1	34	280	0,0591	6,0	4,40—3,83=0,57	13,4	7,4
44	10	1	34	245	0,0553	5,5	4,40—3,83=0,57	12,7	7,2
58	10	1,5	35	360	0,1968	4,3	4,23—3,70=0,53	12,7	8,4
59	10	1,5	35	180	0,0813	8,2	4,23—3,47=0,76	18,0	9,8
59	10	1,5	35	240	0,0981	9,9	4,23—3,33=0,90	21,3	11,4
36	18	1	34	158	0,0500	5,0	4,30—3,77=0,53	12,3	7,3
36	18	1	34	158	0,0529	5,3	4,30—3,77=0,53	12,3	7,0
23	25	0,5	34	130	0,0925	18,5	2,18—1,56=0,52	24	5,5
23	25	0,5	34	127	0,0904	18	2,18—1,58=0,50	23	5,0
62	30	0,5	—	248	0,3229	32,4	4,24—2,64=1,60	37,7	5,3
68	15	2	36	37	0,0320	3,3	4,30—3,98=0,32	7,4	4,1
69	15	2	36	67	0,0260	2,6	4,30—3,99=0,31	7,2	4,6
70	15	2	36	72	0,0301	3,0	4,30—3,97=0,33	7,6	4,6

Tabelle I.

Nr.	Temperatur ° C.	Konzentrat. des Zuckers %	Hefemenge in 25ccm Lösung	Zeit in Min.	Entwickelte CO ₂		Drehungsänderung		Diff.	
					g	%	in Graden	%		
Kurve III	1	30	10	0.5	125	0,0936	7,7	5,37 - 4,67 = 0,70	13,1	5,4
	2	30	10	0.5	181	0,1492	12,2	5,32 - 4,46 = 0,86	16,2	4,0
	3	30	10	1	42	0,0644	5,3	5,33 - 4,80 = 0,53	10,0	4,7
	4	30	10	1	63	0,1160	9,5	5,33 - 4,48 = 0,85	16,0	6,5
	5	30	10	1	232	0,4918	40,3	5,33 - 2,84 = 2,49	47,0	6,7
	6	30	10	1	406	0,7256	59,4	5,33 - 1,85 = 3,48	65,9	6,5
	7	30	10	1	70	0,1376	11,3	5,62 - 4,49 = 1,13	20,1	8,8
	8	30	10	1	213	0,4602	37,5	5,62 - 2,87 = 2,75	48,9	11,4
	9	30	10	1	960	1,0648	87,2	5,62 - 0,24 = 5,38	95,7	8,5
	10	30	10	1	993	1,0702	87,6	5,62 - 0,12 = 5,50	97,9	10,3
	11	30	10	1,5	93	0,3090	25,3	5,32 - 3,50 = 1,82	34,2	8,9
	12	30	10	1,5	97	0,3198	26,2	5,32 - 3,37 = 1,95	36,6	10,4
	13	30	20	1	43	0,0730	3,0	11,66 - 10,10 = 1,56	13,4	10,4
	14	30	20	1	205	0,4148	17,0	11,66 - 8,31 = 3,35	28,7	11,7
	15	30	20	1	361	0,6978	28,5	11,66 - 7,08 = 4,58	39,3	10,8

Tabelle II.

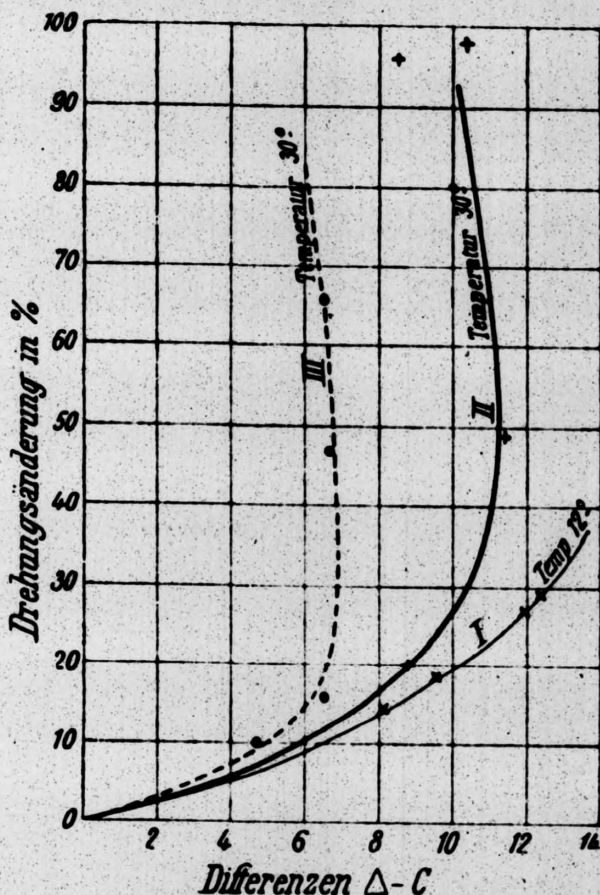
Nr.	Temperatur ° C.	Konzentrat. des Zuckers %	Hefemenge in 25ccm Lösung	Zeit in Min.	Entwickelte CO ₂		Drehungsänderung		Diff.	
					g	%	in Graden	%		
Kurve I	16	11	10	1	185	0,0420	3,4	5,55 - 5,07 = 0,48	8,7	5,3
	17	11	10	1	193	0,0430	3,5	5,55 - 5,05 = 0,50	9,0	5,5
	18	11	10	1	211	0,0548	4,5	5,55 - 5,00 = 0,55	10,0	5,5
	19	12	10	1	224	0,0776	6,4	5,64 - 4,82 = 0,82	14,5	8,1
	20	12	10	1	290	0,1036	8,5	5,64 - 4,62 = 1,02	18,1	9,6
	21	12	10	1	415	0,1808	14,8	5,64 - 4,13 = 1,51	26,8	12,0
	22	12	10	1	478	0,1992	16,3	5,64 - 4,02 = 1,62	28,7	12,4
	23	13	10	1,5	289	0,1842	15,1	5,32 - 4,10 = 1,22	22,9	7,8
	24	13	10	1,5	293	0,2172	17,8	5,32 - 3,91 = 1,41	26,5	8,7
	25	13	10	1,5	300	0,2278	18,6	5,32 - 3,86 = 1,46	27,4	8,8

Die Tabellen I und II enthalten größere Serien, welche durch Klammern gekennzeichnet sind. Jede Serie ist an einem und demselben Tag begonnen und die verschiedenen Versuche sind mit derselben Hefe angestellt. Dagegen unterscheidet sich die Hefe bei den verschiedenen Serien durch Alter, Dauer des Waschens und Abpressens usw. Wegen des etwas verschiedenen Wassergehaltes der Hefen ist an den gefundenen Zahlen eine Korrektur angebracht, so daß sich alle Daten auf eine Hefe von 35% Trockengewicht beziehen.

Drei Serien der obigen Tabellen sind in der Figur 1 dargestellt. In derselben ist die prozentische Drehungsänderung Δ als Ordinate und die Differenz zwischen prozentischer Drehungsänderung Δ und entwickelter Kohlensäure in Prozenten der gesamten entwickelbaren Kohlensäure, C, also die Differenz $\Delta - C$ als Abszisse angegeben.

Für den Fall, daß diese Differenz nur durch die Bildung eines inaktiven Produktes während der Gärung veranlaßt ist, würde also in obiger Figur die Ordinate die prozentische Menge verschwundenen Traubenzuckers, die Abszisse die prozentische Menge des gebildeten inaktiven Produktes darstellen. Für eine solche Annahme liegen aber bis jetzt nicht genügend Anhaltspunkte vor.

Durch die hier angegebenen Messungen ist jedenfalls der Verlauf der eintretenden Differenz während der Gärung fest-



gelegt. Wie aus der Figur 1 und aus den Tabellen I und II ersichtlich, nimmt die Differenz im Anfang der Gärung schnell zu und erreicht dann ein Maximum. Die Größe dieses Maximums ist abhängig von der Temperatur, der Konzentration des Zuckers, der Menge und der Vorbehandlung der Hefe: letzteres zeigen z. B. die Kurven II und III der Figur 1.

Es ist auffallend, daß — nach der biochemischen Literatur wenigstens¹⁾ — die Differenz $\Delta-C$, welche bei der Gärung durch lebende Hefe auftritt, bis jetzt noch nicht studiert worden zu sein scheint. Bei allen einigermaßen exakten Messungen der Gärungsgeschwindigkeit muß sich die dieser Differenz zugrunde liegende Bildung eines aus dem Zucker entstehenden Produktes bemerkbar machen. Der Umstand, daß eine Hefe bei gegebener Gärungsgeschwindigkeit je nach der Vorbehandlung die besprochene Differenz in verschiedenem Grad ausbildet, deutet darauf hin, daß wir es hier mit der Wirkung eines Enzyms zu tun haben, welches weder von demjenigen Gärungsenzym, das die Glukosen angreift, noch von demjenigen, welches die schließliche Bildung von Alkohol und Kohlensäure vermittelt, direkt abhängig ist. Ob dabei ein revertierendes Enzym der Hefe mitwirkt, müssen weitere, besonders präparative Versuche zeigen.

¹⁾ Die brauerei-technische Literatur ist uns hier leider nur unvollständig zugänglich.