

Zur Kenntnis der Hefegärung.

II. Mitteilung.

Von

Hans Euler und Helmer Bäckström.

Mit vier Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. Februar 1912.)

Durch Trockenhefe oder Hefepreßsaft wird Phosphorsäure an einen Kohlenhydratrest organisch gebunden. Den dabei entstehenden Ester sah L. Iwanoff,¹⁾ dem man die ersten Beobachtungen über diese interessante Reaktion verdankt, als eine Triosephosphorsäure an; nach Hardens und Youngs²⁾ eingehenden Untersuchungen liegt eine Hexosediphosphorsäure vor. Jedenfalls ist nunmehr festgestellt, daß auf 6 Kohlenstoffatome nicht ein, sondern zwei Phosphorsäurereste kommen³⁾ und vermutlich existieren, worauf Euler und Fodor⁴⁾ bereits hingewiesen haben, sowohl eine Triosephosphorsäure als eine Hexosediphosphorsäure.

Der von L. Iwanoff studierte Phosphorsäureester bzw. das Natriumsalz desselben wird, wie dieser Forscher exakt nachgewiesen hat, durch Zymin oder Hefanol vergoren. Lebende Hefe ist dagegen, worauf ebenfalls Iwanoff⁵⁾ aufmerksam macht, nicht imstande, den Phosphorsäureester bzw. dessen Salze zu vergären.

¹⁾ Trav. de la Soc. des Nat. de St.-Pétersbourg, Bd. 34, 1905. — Diese Zeitschrift, Bd. 50, S. 281, 1907.

²⁾ Proc. Roy. Soc., Bd. 77, S. 405, 1906. — Young, Proc. Roy. Soc., d. 81, S. 528, 1909. — Biochem. Zeitschrift, Bd. 32, S. 177, 1911.

³⁾ Dieses Ergebnis wird nunmehr auch durch v. Lebedew bestätigt (Biochem. Zeitschrift, Bd. 36, S. 248, 1911).

⁴⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 36, S. 401, 1911.

⁵⁾ Zentralbl. f. Bakteriologie, Bd. 24, S. 4, 1909.

In der Überzeugung, daß die verschiedenen Heferassen weit größere Unterschiede in bezug auf den Gehalt an den einzelnen Enzymen der Gärung aufweisen, als gewöhnlich angenommen wird, haben wir es notwendig erachtet, festzustellen, daß auch von unserer Hefe H der Kohlenhydratester nicht vergoren wird.

0,5 g Natriumsalz des Kohlenhydratphosphorsäureesters werden in 20 ccm Wasser gelöst und mit abgepreßter Hefe (von rund 27% Trockengewicht) versetzt. Die Lösung stand bei 30° während 20 Stunden im Thermostaten in einem kleinen Erlenmeyer-Kölbchen, welches mit einer mit Quecksilber gefüllten Gasbürette in Verbindung stand. Die Kohlensäureentwicklung während dieser Zeit ergibt sich aus folgender Tabelle.

Minuten	60	120	240	360
ccm CO ₂	0,7	0,8	0,85	0,90

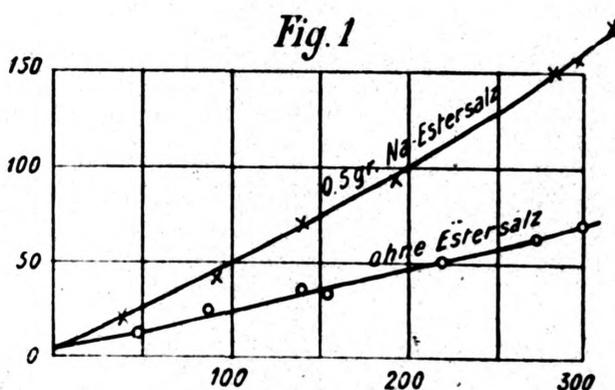
Eine ungefähr gleich große Menge Glukose wie diejenige, welche dem Kohlenhydrat des Esters entspricht, wurde unter genau den analogen Umständen in folgender Weise vergoren.

Minuten	60	120	240	360
ccm CO ₂	8,5	16,2	30,8	49,0

Auch unsere lebende Hefe H ist also nicht imstande, das Phosphorsäureestersalz anzugreifen, unter Umständen, unter welchen Glukose glatt vergoren wird.

Die Erscheinung, welche wir mitzuteilen haben, ist nun folgende:

Setzt man die obige Menge Ester-salz zu 20 ccm einer 20% igen Glukose-lösung und vergärt dieselbe mit 0,25 g lebender Preßhefe, so zeigt sich, daß durch diesen Zusatz die



Gärung stark beschleunigt wird. Dies geht z. B. aus vorstehender Kurve hervor.

Hinsichtlich der Versuchsanordnung ist zu bemerken, daß die Kohlensäure volumetrisch gemessen wurde, und daß die untersuchten Lösungen vor Beginn der Reaktion mit Kohlensäure gesättigt wurden.

Unter den zahlreichen Wiederholungen dieser Versuche führen wir die folgenden an, welche unter genau den gleichen Bedingungen wie der oben erwähnte ausgeführt wurden.

20 ccm 20%ige Glukoselösung.

0,25 g Hefe. — Versuchstemperatur 30°.

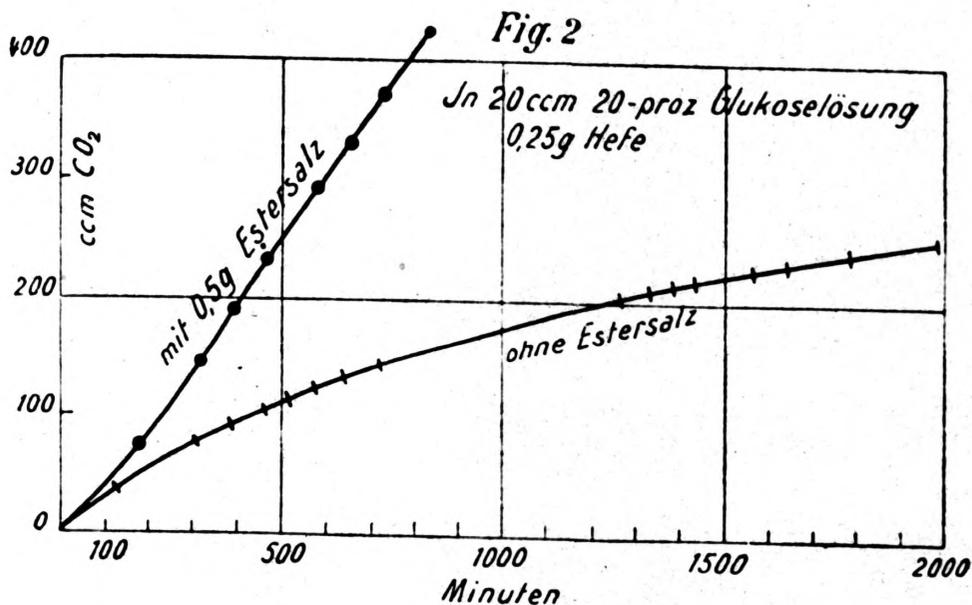
+ 0,5 g Estersalz				Ohne Zusatz	
I.		II.		III.	
Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm
37	8	34	7,5	46	10,5
73	19	70	19	76	17,5
188	52,5	186	50,5	197	45
217	66	215	63,3	228	53
265	91	262	88	275	63
321	123	335	127,5	347	74,5
382	158,5	379	153	391	80,5
450	193,5	459	194	488	95

Nach der Gärung wurde in einem Teil der Lösung der Gehalt an freier Phosphorsäure bestimmt, um zu sehen, ob die erhöhte Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung mit einer Zersetzung des Kohlenhydratphosphates verbunden ist, oder ob die Wirkung desselben als eine rein katalytische zu betrachten ist. Aus je 10 ccm der 450 bzw. 459 Minuten gegorenen Lösung wurden mit Magnesiamischung bei obigem Versuch 0,0081 bzw. 0,0087 g $Mg_2P_2O_7$ erhalten, bei einem analogen Versuch nach 400 Minuten 0,0055 und 0,0043 g $Mg_2P_2O_7$.

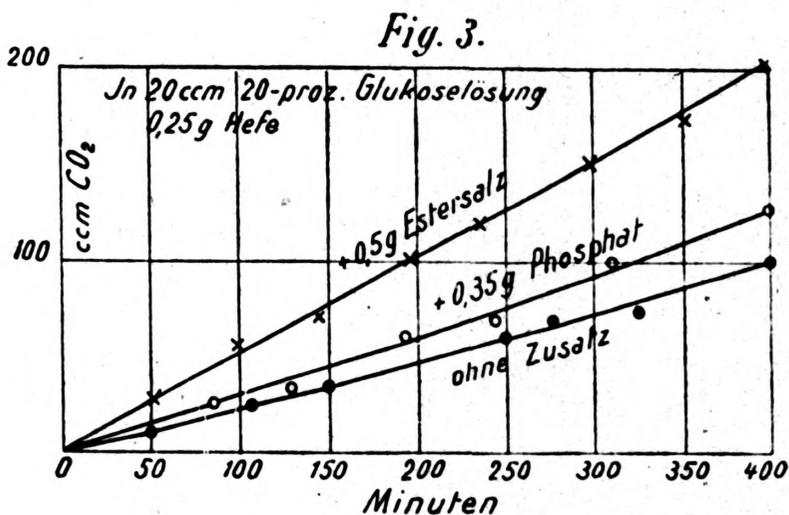
Das reaktionsbeschleunigende Phosphat wird also während der Reaktion nicht gespalten bzw. vergoren.

Der folgende Versuch erstreckte sich über eine bedeutend

längere Zeit, etwa 30 Stunden: der Reaktionsverlauf ist in Fig. 2 dargestellt.

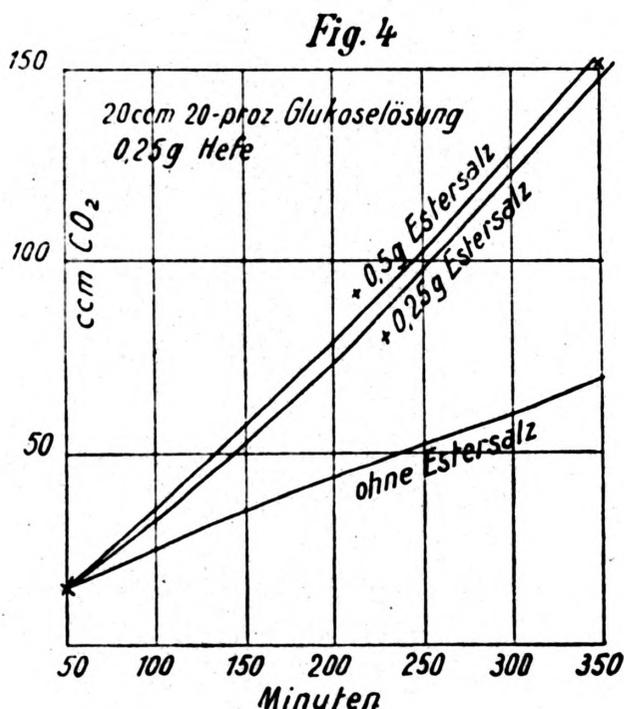


Wir verglichen hierauf die Wirkung des Kohlenhydratphosphates mit derjenigen des freien Natriumphosphates. Der Menge von 0,5 g Natriumsalz des Kohlenhydratphosphorsäureesters entsprechen ungefähr 0,33–0,34 g NaH_2PO_4 ; zum Parallelversuch wurden 0,35 g (neutralisiertes) NaH_2PO_4 angewandt.



Sehr auffallend ist die Konzentrationsfunktion des beschleunigenden Estersalzes. Wie aus der Fig. 4 ersichtlich wird, ist die Reaktionsbeschleunigung durchaus nicht proportional der

zugesetzten Estermenge, vielmehr scheint schon durch kleine Estermengen eine Reaktionsbeschleunigung erzielt zu werden, welche durch weitere Esterzusätze kaum mehr überschritten wird. Der Einfluß der Esterkonzentration wird noch näher verfolgt.



Es erübrigt nun noch, einiges über das angewandte Natriumsalz des Esters zu sagen. Dasselbe wurde aus dem Bleisalz dargestellt und teils direkt mit Alkohol gefällt, teils nochmals über das Bleisalz gereinigt. Ein Vergleich der beiden Präparate ergab keinen wesentlichen Unterschied.

Da der eine von uns gegenwärtig verhindert ist, die Untersuchung weiter zu führen, müssen wir uns auf die Mitteilung des Ergebnisses beschränken, daß das Natriumsalz des Kohlenhydratphosphorsäureesters die Gärung durch lebende Hefe beschleunigt obwohl das Salz selbst von lebender Hefe nicht vergoren oder resorbiert¹⁾ wird.

Die Tatsache, welche der hier mitgeteilten am nächsten zu kommen scheint, ist von L. Iwanoff beobachtet worden; dieser Forscher gibt an,²⁾ daß die durch Hefanol oder Zymin hervorgerufene Gärung durch «Triosephosphorsäure» beschleunigt wird.

«Man kann sich unschwer davon überzeugen», sagt Iwanoff, «daß die wiederholt konstatierte Stimulierung der Gärung durch Phosphate ihre Erklärung in der Bildung gärfähiger

¹⁾ Paine, Proc. Roy. Soc., Bd. 84, S. 389, 1911.

²⁾ Zentralbl. f. Bakteriologie, Bd. 24, S. 1, 1909.

Triosephosphorsäure findet. Daß eine Zugabe von Triosephosphorsäure zur Gärflüssigkeit (Glukose-Hefanolextrakt oder Zymineextrakt) eine sehr intensive Stimulierung zur Folge hat, wird durch folgende Versuche bewiesen:

Stimulierung der Gärung durch Triosephosphorsäure (Iwanoff).
Temp. 21,7°.

Im Manometer	Manometerstand in mm nach Stunden			
	1 ³ / ₄	8	24	
2 g Hefanol	7 ccm 1,6%ige Triosephosphorsäure .	25	59	—
10 ccm 4%ige Glukose				
1,2 » Toluol	7 » Wasser	8	24	—
2 g Hefanol	15 ccm 2%ige Triosephosphorsäure	—	—	135
1 » Saccharose	15 » Wasser	—	—	98

«Aus der Tabelle geht klar hervor, wie stark Triosephosphorsäure die Gärung stimuliert. Sammelt sie sich in der Gärflüssigkeit an, so muß offenbar das Filtrat der letzteren selbst nach dem Aufkochen eine starke Stimulierung bewirken können. Das ist klar aus folgenden Versuchen ersichtlich, in denen die Gärung von Zucker sich vollzieht unter Zusatz von: 1. Wasser, 2. wässrigem Hefanolextrakt, 3. Filtrat einer von Hefanol vergorenen Zuckerlösung, 4. Filtrat einer in Gegenwart von Phosphat vergorenen Zuckerlösung. Zusatz 1—4 wurde einmal ohne voraufgehendes Erhitzen und dann nach $\frac{1}{4}$ -stündigem Kochen auf dem Wasserbade zugegossen.»

Im Manometer	Manometerstand in mm nach Stunden				
	5	13	23	35	47
2 g Saccharose, 1 g Hefanol, 0,2 ccm Toluol und					
1. 15 ccm Wasser	26	21	40	24	24
2. je 15 ccm wässriges Hefanolextrakt	50	52	70	60	55
{ ungekocht					
{ gekocht	39	31	49	40	40
3. je 15 ccm Filtrat nach Gärung	39	44	63	52	50
{ ungekocht					
{ gekocht	29	30	48	37	32
4. je 15 ccm Filtrat nach Phosphatgärung	57	62	85	80	75
{ ungekocht					
{ gekocht	51	43	60	52	51

«Die Tabelle zeigt», fährt Iwanoff fort, «daß am stärksten Filtrat 4 stimuliert, welches mit Sicherheit Triosephosphorsäure enthält, und am schwächsten Filtrat 3, welches die Zuckerzersetzungsprodukte frei ohne Verbindung mit Phosphorsäure besitzt. Die anderen Filtrate haben auch eine stimulierende Wirkung, die nach Harden-Young und Buchner durch Gegenwart von Coenzymen erklärt wurde. Sehr möglich ist es, daß man diese Coenzymwirkung auch auf die Gegenwart von Triosephosphorsäure zurückführen können, wie es für die Gärung mit Phosphatfiltraten offenbar der Fall ist. Der Vergleich der ungekochten Filtrate mit den gekochten zeigt ferner merkbare Unterschiede. Wahrscheinlich beruht ein Teil der stimulierenden Wirkung der ungekochten Filtrate auf einer Zunahme der Gärungsenzyme auf Kosten des Filtrates.»

Gegen die Schlüsse, welche Iwanoff aus seinen eben erwähnten Versuchen gezogen hat, haben Harden und Young¹⁾ Einspruch erhoben. Diese Forscher erinnern an ihre Entdeckung, daß Hefepreßsaft eine dialysierbare thermostabile Substanz enthält, die sie als Koenzym bezeichnen, und welche für den Eintritt der alkoholischen Gärung notwendig ist.

Die Methode — sagen Harden und Young —, welche Iwanoff zur Abtrennung seiner Synthese angewandt hat, war wohl geeignet, aus der Hefe das lösliche Koenzym zu entfernen. Auf Grund eigener Versuche kommen die englischen Forscher zum Resultat, daß Iwanoffs Ergebnisse sich dadurch erklären lassen, daß er durch Waschen des Zymins das Koenzym entfernt hat, und sie sagen schließlich: The facts, that the zymine can thus be rendered quite inactive towards hexosephosphate and that the fermenting power is restored by the addition of the boiled washings also dispose of the suggestion made by Iwanoff and more recently by v. Lebedew, that the hexosephosphate is itself the co-enzyme.

Das experimentelle Ergebnis von Harden und Young konnte der eine von uns mit Th. Berggren an unserem Material vollauf bestätigen:

¹⁾ Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 26, S. 182, 1910.

Gut ausgewaschene Trockenhefe ist nicht imstande, mit reinem Kohlenhydratphosphorsäureestersalz in Glukoselösung Gärung hervorzurufen, während auf Zusatz von Waschflüssigkeit lebhafte Gärung eintritt.

Andererseits steht aber fest, daß das Estersalz, welches, allein zu ausgewaschener Trockenhefe zugesetzt, keine Glukosegärung veranlaßt und somit kein Ko-Enzym im Sinne Hardens und Youngs enthält, die Gärung durch lebende Hefe beschleunigt und dabei selbst nicht (oder höchstens in minimaler Menge) gespalten wird.
