

Über die Reaktionsphasen der alkoholischen Gärung.

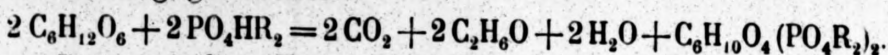
Von

Hans Euler und David Johansson.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. April 1913.)

Seit durch die Arbeiten von Harden und Young, L. Iwanoff, sowie Buchner und Meisenheimer die Teilnahme der Phosphate an der alkoholischen Gärung bekannt geworden ist, mußten bei der Darstellung der Gärungsgleichung die diesbezüglichen neuen Tatsachen berücksichtigt werden. Dies ist von seiten Hardens und Youngs durch folgende Formulierung geschehen:



Später haben Euler und Ohlsén festgestellt, daß durch den Extrakt einer von ihnen untersuchten Trockenhefe reine Glukose nicht angegriffen wird, weder vergoren, noch mit Natriumphosphat verestert wurde. Es war damit nachgewiesen, daß die bekannten Hexosen nicht direkt verestert, sondern zunächst durch ein Enzym umgewandelt werden, welches von dem Alkohol und Kohlensäure entwickelnden Teil der Zymase abtrennbar ist.

Die Existenz und Besonderheit dieses Enzymes, welches Glukose, Fruktose und Mannose, eventuell Galaktose in ein mit Phosphaten veresterbares Kohlenhydrat umwandelt — es wäre als Hexase (Glukase, Fruktase usw.) zu bezeichnen —, kann durch diese Versuche als nachgewiesen gelten. In bezug auf den Gehalt und die Extrahierbarkeit dieses Enzymes sowie der Phosphatase und ihre Abtrennbarkeit von den übrigen Gärungsenzymen verhalten sich die Extrakte der verschiedenen Kulturen ganz verschiedener Trockenhefen je nach ihrer Herkunft und Vorbehandlung verschieden; die von Euler und Ohlsén untersuchte Hefe, deren Extrakt reine Glukose gar nicht angreift, mit lebender Hefe vorbehandelte Glukose aber

¹⁾ Proc. Roy. Soc., Bd. 80, S. 299, 1908.

²⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 27, S. 313, 1911.

Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 468, 1912.

verestert (vgl. die zit. Mitteilung), bildet offenbar einen extremen Fall. Bei der großen Mehrzahl der Hefen gehen auch andere Gärungsenzyme in den Extrakt über, indessen läßt sich auch bei allen diesen mehr oder weniger deutlich der Unterschied im Verhalten der reinen und der vorbehandelten Glukose beobachten.¹⁾

Harden und Young²⁾ haben bei der Besprechung neuerer Arbeiten mit Recht betont, daß ihre Auffassung mit den Resultaten von Euler und Ohlsén nicht in Widerspruch steht.

Die genannten Forscher stützen ihre theoretische Auffassung hauptsächlich durch Versuche, welche mit Hefepreßsaft angestellt worden waren. Einzelne Versuche haben sie auch mit Zymin und mit Macerationssaft von Münchener Trockenhefe (Schroder)³⁾ ausgeführt. Allerdings nur in der Weise, daß die entwickelte Kohlensäuremenge bestimmt wurde, welche der zugesetzten Menge des Phosphates entsprach.

Nach den im hiesigen Laboratorium gewonnenen Ergebnissen ergab sich für uns die Frage: In welchem Umfang gilt in solchen Extrakten von Trockenhefe, welche Glukose vergären, die Harden-Youngsche Formel, d. h. ist überall da, wo in Gegenwart von Phosphat Zucker vergoren wird, und während der ganzen Reaktion die Menge der entwickelten Kohlensäure mit der Menge gebundenen Phosphats durch die Harden-Youngsche Gleichung verknüpft?

Die vorliegende Mitteilung enthält eine Prüfung der eingangs erwähnten Gärungsgleichung in ziemlich weitem Umfang, sowohl bezüglich der Vergärung mit Trockenhefe, wo bisher nur wenige quantitative Angaben vorlagen, als auch hinsichtlich der Vergärung durch Hefeextrakt und durch lebende

¹⁾ Aus Hefe vom Münchener Typus lassen sich bekanntlich nach geeigneter Entwässerung bei nicht zu hoher Temperatur beinahe alle Gärungsenzyme extrahieren, so daß dieser Extrakt sich wie Buchnerscher Hefepreßsaft verhält. Obergärige Bierhefe hält dagegen auch nach der Entwässerung ihre Gärungsenzyme so fest, daß in vielen Fällen weder eine Phosphatbindung noch eine Gärung mit vorbehandelter oder unvorbehandelter Glukose eintritt.

²⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 40, S. 458, 1912.

³⁾ Centr. f. Bakt. (11), S. 178, 1910.

(frische) Hefe, worüber Harden und Young keine Messungen mitgeteilt haben.

Eine solche Prüfung erschien bei der Bedeutung der besprochenen Formel für die gesamte Gärungschemie um so wünschenswerter, als eine experimentelle Bestätigung der grundlegenden Ergebnisse von Harden und Young bisher noch von keiner anderen Seite erbracht worden war.

Allgemeines über die Versuchsbedingungen.

Die Versuchstemperatur betrug, wenn keine besonderen Angaben gemacht sind, stets 27°.

Sämtliche Lösungen wurden vor Eintritt der Gärung mit CO₂ gesättigt. Die Messungen der entwickelten Kohlensäure geschahen volumetrisch.

Der Gehalt an freiem Phosphat wurde, wenn nicht anders bemerkt, in je 10 ccm durch Fällung mit Magnesiummischung bestimmt.

Versuche.

A. Versuche mit Extrakt von Trockenhefe.

1.

Bierhefe, bei 40—50° im Vakuum getrocknet, wird drei Stunden mit der 5fachen Menge Wasser bei 27° extrahiert, und hierauf filtriert, bis der Saft geklärt ist.

20%ige Glukoselösung wurde mit lebender Hefe während etwa 10 Minuten angegoren, wobei die Drehung (im 50 mm-Rohr beobachtet) von 5,52° auf 5,27° zurückging. Diese so vorbehandelte Lösung wurde filtriert und zwecks Sterilisation gekocht.

25 ccm Extrakt aus Trockenhefe + 5 ccm 10%ige Lösung von Na₂HPO₄
+ 12 H₂O + 0,5 ccm Toluol.

+ 20 ccm reine Glukoselösung.

+ 20 ccm angegorene Glukoselösg.

Min.	ccm CO ₂	g Mg ₂ P ₂ O ₇ in 10 ccm
0	—	552 · 10 ⁻⁴
120	4	536
176	4,5	534
270	6,5	514
308	7,0	512

Min.	ccm CO ₂	g Mg ₂ P ₂ O ₇ in 10 ccm
0	—	557 · 10 ⁻⁴
120	3,6	497
190	11	430
274	27	252
303	35	133

Sämtliche Lösungen wurden in diesem und in allen folgenden Versuchen vor Eintritt, der Gärung mit CO_2 gesättigt. Der Gehalt an freiem Phosphat wurde in je 10 ccm durch Fällung mit Magnesiamischung bestimmt.

2.

Der Zusatz von Toluol verzögert die obige Reaktion nicht unbedeutend, wie folgende Parallelversuche zeigen:

Die Bierhefe war bei $30\text{--}40^\circ$ getrocknet. Extraktion und Vorbehandlung der Glukose wie oben.

25 ccm Extrakt aus Trockenhefe + 5 ccm 10%ige Lösung von Na_2HPO_4
+ 12 ccm H_2O + 20 ccm vorbehandelte, 20%ige Glukose.

Ohne Toluol.

+ 1 ccm Toluol.

Min.	ccm CO_2	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ in 10 ccm
0	—	$527 \cdot 10^{-4}$
127	6	470
285	40	25
380	48	10

Min.	ccm CO_2	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ in 10 ccm
0	—	$529 \cdot 10^{-4}$
123	1,8	496
286	8,0	418
363	15	337
390	20	251

3.

Versuchsordnung wie in Versuch 1. Reaktionstemperatur 17° . (Die Glukoselösung wurde diesmal etwas längere Zeit vorbehandelt, Drehungsrückgang von $5,33\text{--}4,92^\circ$.)

Vorbehandelte Glukose + 0,5 ccm Toluol.

Minuten	ccm CO_2	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10^4$ in 10 ccm
0	—	565
97	10	388
149	20	261
173	37	183
287	45	10

Man bemerkt, daß in diesem Versuch die Reaktion schneller verlief als im vorhergehenden Versuch 2; dies dürfte daher rühren, daß diesmal eine weitergehende Vorbehandlung der Glukose stattgefunden hat.

4.

Nachdem es sich gezeigt hatte, daß die Phosphatbindung auch durch den Extrakt der hier untersuchten Hefe nach einer Vorbehandlung der Glukose in sehr verstärktem Maße eintritt, und nachdem es sich ferner bestätigt hatte, daß zwischen Kohlen-säureentwicklung und Phosphatbindung der von Harden und Young angegebene Zusammenhang besteht, wurde untersucht, ob in einer vorbehandelten Zuckerlösung, welche auf ein Molekül Hexose ein Molekül PO_4 enthält, die gesamte Menge PO_4 gebunden wird. Dies würde darauf hindeuten, daß in einer solchen Lösung, entgegen dem, was wir früher annahmen¹⁾, das gesamte Kohlenhydrat durch Vorbehandlung umgewandelt wird und zur Veresterung geeignet wäre.

Der Versuch zeigte, daß dies nicht der Fall war.

Bei 40—50° im Vakuum getrocknete Bierhefe wurde mit der 5fachen Menge Wasser 3 Stunden lang bei 27° extrahiert. (Extrakt A.)

25 ccm Extrakt A + 10 ccm Wasser + 5 ccm 10%ige Lösung
von Na_2HPO_4 + 12 ccm H_2O + 0,5 ccm Toluol.

+ 10 ccm reine Glukose.

+ 10 ccm vorbehandelte Glukose.

Minuten	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10^4$ in 10 ccm
0	569
141	543
296	529
415	515

Minuten	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10^4$ in 10 ccm
0	562
147	544
300	507
420	480

Versuchstemperatur war 17°.

¹⁾ Euler und D. Johansson, Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 347, 1912.

²⁾ Euler und Th. Berggren, Zeitschrift für Gärungsphysiologie, Bd. 1, S. 203, 1912.

Nach Harden und Young sind zur Prüfung der von Lebedew geäußerten Gärungshypothese folgende Versuche mit Extrakt von Münchener Hefe (Schroder) ausgeführt worden:

Versuch 1. Zwei Gemische mit je 20 ccm Macerationssaft, 0,5 g Fruktose enthaltend, wurden im Brutschrank angesetzt und ihre Gärung beobachtet. Es wurde ein Maximum von 28 ccm pro 5 Min. erreicht, das nach 25 Min. auf 5 ccm und nach 35 Min. auf 1,5 ccm per 5 Min. herabsank. Eine dritte Probe von 20 ccm, der man 2 g überschüssigen Zucker zugefügt hatte, ergab denselben Maximalwert, jedoch fiel dieser nur auf 5 ccm in 5 Min. und blieb damit konstant.

Nach 35 Min. versetzte man die erste Probe mit 0,5 g Fruktose, die zweite dagegen nicht — die Gärungen hielten an. Die Ergebnisse erhellen aus den Spalten 1 der Tabelle, welche die Anzahl Kubikzentimeter CO₂ per Minuten angibt.

Versuche 2. 90 ccm Hefesaft wurden mit 5 g Fruktose und 15 ccm einer 0,3 molaren Lösung Na₂HPO₄ im Thermostaten angesetzt, bis alles freie Phosphat verschwunden und der Überschuß an Zucker aufgebraucht war. Aus diesem Gemisch wurden zwei Portionen von je 20 ccm entnommen, die eine wurde mit 5 ccm Wasser, die andere mit 5 ccm, 1 g Fruktose enthaltend, versetzt. Die Resultate sind unter Nr. 2 in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Minuten nach Zusatz	1 mit Fruktose	1 ohne Fruktose	2 mit Fruktose	2 ohne Fruktose
5	13,4	1,5	11,6	1,7
10	5,6	1,2	5,6	1,4
15	4,9	1,3	5,0	1,6
20	5,3	1,4	5,1	1,4
25	5,3	1,3	4,7	1,6
40	4,8	1,4	4,4	1,8
45	5,0	1,4	4,5	1,7

Der dritte Versuch wurde in der folgenden Weise angestellt. Drei Portionen von je 15 ccm Macerationssaft wurden mit 0,5 g Glukose wie vorher im Brutschrank angesetzt. Sobald die Gärung von dem Maximum von 19 ccm per 5 Min. heruntergegangen war und sich 20 Min. auf diesem Wert erhalten hatte, wurden 3 Parallelversuche angestellt, in welchen zu obiger Lösung zugesetzt wurde:

- zu 1. 10 ccm neutralisierte Lösung von Hexosephosphorsäure (0,5 g Säure in 100 ccm),
- » 2. 15 » der obigen Hexosephosphatlösung,
- » 3. 10 » Hexosephosphat + 0,5 g Glukose.

Die per 5 Min. entwickelten Kubikzentimeter CO₂ waren:

Minuten nach Zusatz	1.	2.	3.
5	2,9	2,5	9,7
10	2,3	2,2	3,8
15	2,0	1,9	3,7
20	1,6	1,6	4,3
25	1,6	1,7	3,7
30	1,5	1,5	3,8
35	1,5	1,5	3,8

B. Versuche mit Trockenhefe.

Versuche, bei welchen Trockenhefe in der Zuckerlösung aufgeschwemmt ist, machen bedeutend größere Schwierigkeiten, wenn man gleichzeitig die entwickelte Menge Kohlensäure und die gebundene Menge Phosphat bestimmen will. Harden und Young (Zentralbl. Bakt. (II) 26, 178; 1910) geben einen Versuch mit Zymin an, bei welchem nur die Menge der entwickelten Kohlensäure und die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt wurde, nicht aber die Geschwindigkeit der Phosphatbindung.

Wir arbeiteten folgendermaßen: Zu jedem Versuch wurden etwa 6 Kolben angesetzt, welche mit Wasser und Trockenhefe, eventuell mit Toluol im Thermostaten bei 27° etwa eine halbe Stunde verweilten und dann mit der Phosphatlösung versehen wurden. Unmittelbar darauf wurde die Zuckerlösung zugesetzt, wodurch also die Reaktion begann. Alle Lösungen waren mit CO₂ gesättigt. Unmittelbar nach Zusatz des Zuckers wurden die Kolben durch Kapillarröhren mit Gasbüretten verbunden. Dieselben waren mit Quecksilber gefüllt, und der Gasraum der Kolben befand sich ständig unter einem Unterdruck von etwa 150 mm. Nach geeigneten Zeitintervallen wurde nach Aufhebung der Übersättigung durch Schütteln das Volumen des aus einem Kolben entwickelten Gases abgelesen, und der Kolbeninhalt mit 10 ccm Ammoniak versetzt, um die Reaktion abubrechen. In 10 ccm der abfiltrierten Flüssigkeit wurde dann die freie Phosphorsäure in der gewöhnlichen Weise bestimmt. Die so erhaltenen Reaktionskurven sind also das Ergebnis aus 6 Einzel-

versuchen und demgemäß sind die Abweichungen der einzelnen Bestimmungen voneinander erheblich größer, als wenn Proben aus ein und derselben Lösung entnommen werden können; diesen Umstand möchten wir besonders hervorheben. Andererseits wird aber durch unsere Versuchsanordnung ein eindeutiges Endergebnis gesichert.

5.

Hefe bei 30—40° im Vakuum getrocknet.

In jedem Kolben befindet sich:

2 g Trockenhefe, 5 ccm Wasser,	Mischung M
10 ccm 10%ige Lösung von Dinatriumphosphat	
+ 12 H ₂ O,	
25 ccm 16%ige Glukoselösung	

5 a) Mischung M (ohne Toluol).

Min.	ccm CO ₂	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ in 10 ccm	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ gebunden	Äquiv. CO ₂ a	Äquiv. PO ₄ b	b/a
0	—	747	0	—	—	—
123	20	508	239	0,82	1,09	1,33
193	35	329	418	1,44	1,88	1,30
204	50	190	557	2,06	2,51	1,22
236	75	44	703	3,08	3,18	1,03

5 b) Mischung M + 0,2 ccm Toluol.

Min.	ccm CO ₂	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ in 10 ccm	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ gebunden	Äquiv. CO ₂ a	Äquiv. PO ₄ b	b/a
0	—	711	0	—	—	—
145	15	508	203	0,62	0,91	1,46
217	25	389	322	1,03	1,45	1,41
112	30	308	403	1,23	1,81	1,47
340	40	207	504	1,64	2,27	1,38
141	50	153	558	2,05	2,51	1,22
232	75	ca. 30	681	3,07	3,07	1,00

Bemerkenswert ist unter den Ergebnissen der eben mitgeteilten Tabellen die stetige Abnahme der Quotienten b/a, also des Verhältnisses zwischen gebundenem Phosphat und

entwickelter Kohlensäure, welches nach der Harden-Youngschen Formel den Wert l haben soll. Diese offenbar für das Verständnis des Gärungsvorganges wichtige Tatsache wird in einem anderen Zusammenhange näher diskutiert werden. Hier sei nur darauf hingewiesen, daß der gesamte Quotient den von der Theorie geforderten Wert l annimmt, sobald der Überschuß an Phosphat verschwunden ist; die Abnahme der Werte b/a hängt also offenbar mit dem von Harden und Young gefundenen¹⁾ verzögernden Einfluß zusammen, welchen überschüssiges Phosphat auf die Entwicklung der Kohlensäure ausübt. Die genannten Forscher haben diese Einwirkung eingehend studiert,²⁾ aber bis jetzt noch nicht erklären können.

6.

In folgendem Versuch befanden sich in jedem Kolben: 2 g Trockenhefe, 10 ccm Wasser, 5 ccm 10%ige Phosphatlösung und 0,2 ccm Toluol und 25 ccm 16%ige Glukoselösung. Die Phosphatanalysen beziehen sich in diesem Versuch ausnahmsweise auf 20 ccm Lösung.

Dieser Versuch enthielt also nur die halbe Phosphatmenge des vorhergehenden; dies hatte zur Folge, daß hier die Gärung und Phosphatbindung sofort eintrat, während im Versuch 5 etwa 100 Minuten bis zum Eintritt der Gärung verstrichen.

Min.	ccm CO ₂	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ in 20 ccm	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ gebunden	Äquiv. CO ₂ a	Äquiv. PO ₄ b	a/b
0	—	810	—	—	—	—
12	10	548	262	0,41	0,59	1,44
19	20	190	620	0,82	1,39	1,69
23	30	117	693	1,23	1,56	1,27
28	40	73	737	1,64	1,66	1,01

7.

Es wurde statt der bei 30—40° im Vakuum getrockneten Hefe eine bei Zimmertemperatur getrocknete Hefe angewandt

¹⁾ Proc. Roy. Soc., Bd. 80, S. 299, 1908.

²⁾ Proc. Roy. Soc., Bd. 81, S. 336, 1909.

und kein Toluol zugesetzt. Dadurch wurden etwas andere Resultate erhalten, insofern nun mehr als die mit der gebundenen Phosphorsäure äquivalente Menge Kohlensäure entwickelt wurde.

Füllung der Kolben wie oben, aber ohne Toluol. Die Phosphatanalysen beziehen sich auf 20 ccm.

Min.	ccm CO ₂	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ in 20 ccm	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ gebunden	Äquiv. CO ₂ a	Äquiv. PO ₄ b	a/b
0	—	770	—	—	—	—
8	15	542	228	0,62	0,51	0,82
12	20	477	293	0,82	0,66	0,81
14	25	426	344	1,03	0,77	0,75
17	30	363	407	1,23	0,92	0,75
27	50	252	528	2,05	1,18	0,58
39	80	120	650	3,28	1,46	0,45

Bei diesem Versuch, welcher also ohne Toluolzusatz ausgeführt wurde, ergeben sich Werte von b/a, welche kleiner sind als 1. Diese Tatsache erklärt sich dadurch, daß ohne Toluol eine sehr erhebliche Hydrolyse des gebildeten Kohlenhydratphosphates eintritt, welches im Verlauf der Reaktion der Phosphatbindung entgegenwirkt und so die Menge des gebundenen Phosphates vermindert. Zu Beginn der Reaktion ist diese Hydrolyse am geringsten, da der Überschuß des Phosphates die Hydrolyse hemmt.¹⁾

8.

Die folgenden Versuche unterscheiden sich von den vorhergehenden dadurch, daß nicht mehr ein großer Überschuß von Zucker zur Vergärung kam, sondern auf ein Molekül Phosphat genau ein Molekül Zucker. Es sollte besonders ermittelt werden, ob bei der Vergärung einer solchen Mischung die Glukose vollständig verschwunden ist, sobald das Phosphat vollständig

¹⁾ Bezüglich der Wirkung des überschüssigen Phosphates vgl. Harden und Young, Proc. Roy. Soc., Bd. 80, S. 305, 1908.

verestert ist, und ferner, ob hier gebundenes Phosphat und auftretende Kohlensäure in Übereinstimmung mit der Gärungsgleichung von Harden steht.

In jedem Kolben befanden sich:

3 g Trockenhefe (getrocknet bei 30—40°), 20 ccm Wasser, 10 ccm Phosphatlösung, 10 ccm 6%ige Glukoselösung; kein Toluol.

Min.	ccm CO ₂	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ in 20 ccm	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ gebunden	Äquiv. CO ₂ a	Äquiv. PO ₄ b	b/a
0	—	748	—	—	—	—
7	15	415	333	0,62	1,50	2,42
9	30	261	487	1,23	2,19	1,78
12	40	230	518	1,64	2,33	1,42
16	60	131	617	2,46	2,77	1,12
21	75	311	437	—	—	—
32	110	446	302	—	—	—
82	180	743	5	—	—	—

Wie aus der Tabelle hervorgeht, verschwindet das freie Phosphat vollständig, sondern nimmt von einem gewissen Zeitpunkt an wieder zu. Dies beruht darauf, daß der bereits gebundene Kohlenhydratphosphorsäureester wieder gespalten wird. Diese Rückbildung des freien Phosphates tritt in erster Linie dann ein, wenn das Reaktionsgemisch kein Toluol oder anderes antiseptisches Mittel enthält, wie schon früher von uns angestellte Versuche (diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 178, 1912) ergeben haben. Ferner scheint diese Spaltung in Abwesenheit von Zucker in stärkerem Maße einzutreten, als wenn Überschuß von Zucker vorhanden ist.

Der Einfluß des Toluols geht auch aus folgendem Versuch hervor:

9 a)

Versuchsbedingungen wie 8. Zusatz von 2 ccm Toluol zu 40 ccm Lösung.

Minuten	ccm CO ₂	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ in 10 ccm
0	—	767
7	15	324
13	40	122
26	60	37
59	80	89
116	105	164

Zunächst ist darauf hinzuweisen, daß die Reaktion trotz der sehr erheblichen Menge Toluol mit nicht unbedeutender Geschwindigkeit verläuft. Die Rückbildung des freien Phosphates ist, wie man sieht, viel geringer als im Versuch 8a ohne Toluol.

Übrigens wird die Rückspaltung schon durch geringere Mengen Toluol erreicht, wie aus folgendem Versuch hervorgeht:

9b)

2,5 g Trockenhefe in 40 ccm Mischung wie im Versuch 8. Zugesezt 0,3 ccm Toluol.

Minuten	ccm CO ₂	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ in 10 ccm
0	—	732
23	20	381
26	30	221
33	40	147
36	60	126
98	100	202

9c)

Wie auch aus den Versuchen 9a schon hervorgeht, ist in Gegenwart von Toluol die Kohlensäureentwicklung stark verzögert, sobald der Zucker an das Phosphat gebunden ist. In Abwesenheit von Toluol geht dagegen die Kohlensäureentwicklung weiter.

Minuten	ccm CO ₂	
	ohne Toluol	mit 0,2 ccm Toluol
15	60	60
25	88	78
35	110	90
50	144	106
60	164	114
80	180	125

Es ergibt sich also als allgemeines Resultat, daß die enzymatische Spaltung des Kohlenhydratphosphorsäureesters durch antiseptische Mittel wie Toluol stark gehemmt wird.

10.

Wenn die Kohlensäureentwicklung und die Phosphatbindung so verknüpft sind, daß auf 1 Molekül gebundenes Phosphat 1 Molekül entwickelte Kohlensäure kommt, so muß aller Zucker verschwunden sein, wenn alles Phosphat gebunden ist. Die Abwesenheit des unveränderten Zuckers kann durch die optische Drehung der Lösung konstatiert werden.

3 Kolben wurden in derselben Weise gefüllt wie im Versuch 9a. Toluolzusatz 0,5 ccm.

Minuten	ccm CO ₂	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ in 10 ccm	Drehung im 50 mm-Rohr
0	—	761	0,65°
20	50	105	0,36°
23	60	62	0,31°

Drehung des Extraktes von 3 g Trockenhefe in 50 ccm H₂O 0,32°.

Drehung von 40 ccm 6%iger Glukoselösung + 40 ccm H₂O 0,35°.

Die Drehung der ursprünglichen Lösung, 0,65°, setzt sich zusammen aus derjenigen des Zuckers, 0,35, und derjenigen der aus der angewandten Menge Trockenhefe gelösten Stoffe, besonders des Eiweißes, 0,32. Korrigiert man für letztere, so betrug die Drehung des in der Lösung enthaltenen Zuckers

— 0,01°, ein Wert, der vollständig im Bereich der Versuchsfehler liegt.

Es zeigt sich also, daß, wenn die Phosphorsäure gebunden ist, wirklich alle Glukose verschwunden ist.

11.

Zur Beurteilung der vorhergehenden Versuche ist es wesentlich, den Grad der unter den eingehaltenen Bedingungen eintretenden Selbstgärung der Hefe zu kennen. Wir führen folgende Versuche an:

Mi- nuten	ccm CO ₂		
	3 g Trockenhefe 10 ccm 6%ige Glukose 30 „ H ₂ O 2 „ Toluol	3 g Trockenhefe 30 ccm H ₂ O 2 „ Toluol	3 g Trockenhefe 10 ccm 0,3 mol. Na ₂ HPO ₄ 30 „ H ₂ O 2 „ Toluol
20	17	12	2,4
40	27	21	—
70	39	32	19
100	48	43	—
150	64	60	50

Die hier tabellierten Zahlen sind in mehrfacher Hinsicht bemerkenswert. Zunächst ist darauf hinzuweisen, daß bei Anwendung der obigen Menge Trockenhefe und in Gegenwart von Toluol die Kohlensäureentwicklung in Abwesenheit von Glukose nahezu ebenso stark ist wie bei Zusatz von 0,6 g Glukose. Es tritt also mit Trockenhefe eine ähnliche Erscheinung ein, wie die, welche wir vor kurzem bei Versuchen mit lebender Hefe gefunden haben. (Diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 180; 1912.)

Besonders auffallend ist aber, daß, wie die letzte Spalte der obigen Tabelle zeigt, die Selbstgärung der Trockenhefe durch zugesetztes Phosphat anfangs sehr stark gehemmt wird, daß aber diese Verzögerung nach einiger Zeit abnimmt und schließlich zu verschwinden scheint. Wir werden auf dieses Phänomen noch zurückkommen und erwähnen nur, daß nach unseren neueren und auch nach früheren Versuchen ein Überschuß von Phosphat die Veresterungsgeschwindigkeit herabsetzt.

12.

Im folgenden Versuch ist zur näheren Untersuchung der Selbstgärung in Gegenwart von Phosphat auf 3 g Trockenhefe nur 5 ccm 0,3- (10%ige) Natriumphosphatlösung angewandt worden. Gleichzeitig mit der Gärung wurde die Phosphatbindung verfolgt.

Die 3 g Trockenhefe wurden zunächst mit 25 ccm Wasser und 0,5 ccm Toluol während einer Stunde im Thermostaten belassen und dann mit der Phosphatlösung versetzt.

Minuten	ccm CO ₂	g Mg ₂ P ₂ O ₇ · 10 ⁴ in 10 ccm
0	—	450
14	15	296
45	40	200
78	55	265

Es tritt also auch ohne Zusatz von Zucker eine bedeutende Phosphatbindung ein. Für die Zeit 14 Minuten entspricht die entwickelte Kohlensäure (0,62 mg-Äquiv.) angenähert dem gebundenen Phosphat (0,55 mg-Äquiv.) Für die anderen Zeiten ist eine solche Übereinstimmung nicht zu erwarten, da sich bereits die Rückspaltung des Kohlenhydratphosphates bemerkbar macht.

Es fragt sich nun, in welcher Form das von der Hefe gelieferte Kohlenhydrat in der Trockenhefe enthalten ist. Die in obigem Versuch verbrauchte Phosphatmenge entspricht etwa 0,15 g Zucker, wonach die Hefe 5%ig in bezug auf dieses Kohlenhydrat wäre. Es wurde nun die gleiche Menge Hefe mit 200 ccm heißen Wassers extrahiert, also unter Ausschluß von Enzymwirkungen. Im Filtrat wurde der Zucker nach Pavy titriert, wobei eine Reduktion erhalten wurde, welche 0,025 g Traubenzucker entspricht. Es konnte also nur $\frac{1}{6}$ des vergorenen Zuckers in Form von Hexosen extrahiert werden. Die Drehung dieses Extraktes betrug im 200 mm-Rohr 0,45°.

Daß dieser Extrakt ein Disaccharid enthalten hat, ist sehr unwahrscheinlich, und es ist also anzunehmen, daß der in obigem Versuch vergorene bzw. gebundene Zucker während

der beobachteten Reaktionen aus höheren Kohlenhydraten, vermutlich Glykogen und Dextrinen gebildet worden ist. Eine Gärung wurde bekanntlich auch bei Versuchen mit Hefepreßsaft beobachtet, welche ohne Zusatz von Zucker angestellt worden waren (Harden u. Young, Proc. Roy. Soc., Bd. 80, S. 305, 1908).

C. Versuche mit lebender Hefe.

In 6 Proben wurden je 6 g lebende Hefe in 10 ccm 40%iger Rohrzuckerlösung mit 0,2 ccm Toluol $\frac{1}{2}$ Stunde stehen gelassen. Hierauf wurden 10 ccm 20%ige Lösung von $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$ zugesetzt. Nach geeigneten Zeitintervallen wurde jede Probe mit 20 ccm 2-norm. Ammoniak abgebrochen. Die Phosphorsäureanalysen wurden an je 5 ccm Lösung ausgeführt. Versuchstemperatur 27°.

Mi- nuten	ccm CO_2	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10^4$ in 5 ccm	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10^4$ gebunden	Äquiv. CO_2 a	Äquiv. PO_4 b	b/a
0	0	773	0	—	—	—
39	30	719	54	1,23	0,39	0,32
64	60	651	122	2,46	0,88	0,36
70	80	555	218	3,28	1,61	0,49
85	110	457	316	4,51	2,27	0,50
97	140	317	456	5,74	3,28	0,57
106	160	238	535	6,56	3,85	0,59

Ein ganz analoger Versuch wurde mit 12mal so großen Mengen Hefe und Lösungen angestellt. Gegen Ende des Versuchs wurden für die gebundene Phosphorsäure und die entwickelte Kohlensäure folgende Werte gefunden:

Mi- nuten	ccm CO_2	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10^4$ in 5 ccm	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10^4$ gebunden	Äquiv. CO_2 a	Äquiv. PO_4 b	b/a
77	1850	48	316	75,8	59	0,78

Zu den bei diesen Versuchsreihen erhaltenen auffallend kleinen Werten der Quotienten b/a soll einstweilen nur bemerkt werden, daß die Reaktion in Gegenwart eines großen Überschusses an Zucker stattgefunden hat.

Man kann in diesen Fällen die Versuchszahlen in der

Weise berechnen, daß man nicht die absoluten Mengen der entwickelten Kohlensäure in Betracht zieht, sondern, wie dies Harden und Young tun, den Mehrbetrag, welcher per Zeiteinheit durch die Gegenwart des Phosphates hervorgerufen wird. Dies soll auch gelegentlich einer an anderer Stelle folgenden ausführlichen Diskussion des Gärungsmechanismus geschehen. Immerhin mag betont werden, daß uns die Hardensche Berechnungsweise ein weniger deutliches Bild der Gärungsvorgänge zu geben scheint, als die obige.

Zusammenfassung.

Als Hauptergebnis unserer Versuche kann angegeben werden, daß sich die Harden-Youngsche Gärungsgleichung in weitem Umfange bestätigt; d. h. die Menge der entwickelten Äquivalente CO_2 und des gebundenen Phosphates stehen unter Einhaltung gewisser Vorbedingungen im konstanten Verhältnis 1.

Dagegen ist der Mechanismus der Gärungsvorgänge noch nicht aufgeklärt, ebensowenig wie der Wirkungsbereich der einzelnen Gärungsenzyme.

Für die Weiterentwicklung der Gärungstheorie sind, abgesehen von der Äquivalenz der entwickelten Kohlensäure und des gebundenen Phosphates, folgende Tatsachen in erster Linie in Betracht zu ziehen:

Die Gärung beginnt mit einer enzymatischen Umwandlung der Hexosen in ein Kohlenhydrat, welches mit Phosphaten verestert werden kann.

Die mit der Veresterung verknüpfte Kohlensäureentwicklung wird durch überschüssiges Phosphat gehemmt. (Harden und Young.)

Diese durch Phosphate beeinflusste Gärung wird durch Zusatz von Fruktose beschleunigt. (Harden und Young.)

Neben dem Hexosediphosphat wird noch ein Triosemonophosphat gebildet.

Die von Harden und Young nachgewiesene enzymatische Hydrolyse des Kohlenhydratphosphorsäureesters wird durch Toluol stark gehemmt.