

## Über Alkoholgärung.

Von

S. Kostytschew.

V. Mitteilung.

### Über Eiweißspaltung durch Dauerhefe in Gegenwart von Zinkchlorid.

Von

S. Kostytschew und W. Brilliant.

(Aus dem botanischen Laboratorium der Frauenhochkurse in St. Petersburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. Mai 1913.)

In der ersten Mitteilung<sup>1)</sup> wurde dargetan, daß Zinkchlorid eine äußerst eigentümliche Wirkung auf die Gärung von Dauerhefe ausübt. Ein Zusatz ganz geringer Menge von  $ZnCl_2$  zu der gärenden Flüssigkeit bewirkt die Bildung von Acetaldehyd, welcher bei Abwesenheit von Zinkchlorid höchstens nur in Spuren auftritt. Die weiteren Untersuchungen ergaben, daß die Bildung von Acetaldehyd nur bei Zuckervergärung stattfindet.<sup>2)</sup> Sehr beachtenswert ist die tiefgreifende Veränderung von Zuckerabbau, die durch geringe Mengen von löslichen Zinksalzen hervorgerufen wird.<sup>3)</sup> Nun ist es von Interesse zu untersuchen, ob die Wirkung von Zinkchlorid durchaus spezifisch ist und also nur die Tätigkeit der eigentlichen zuckerspaltenden Fermente berührt, oder im Gegenteil verschiedenartige fermentative Vorgänge beeinflusst.

Zahlreiche Untersuchungen verschiedener Forscher ergaben, daß zwischen dem Zuckerabbau und dem Eiweißabbau

<sup>1)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 130 (1912).

<sup>2)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 93 (1913).

<sup>3)</sup> Vgl. die vorstehende Mitteilung.

durch Dauerhefe bezw. durch gärfähige Hefesäfte ein deutlicher Antagonismus besteht. Die Wirkung des proteolytischen Fermentes übt einen hemmenden Einfluß auf die Zymasegärung aus. Infolgedessen wird die Zymasegärung im allgemeinen durch diejenigen Faktoren herabgesetzt, welche die Tätigkeit des proteolytischen Fermentes befördern. Im Gegenteil sind alle diejenigen Einflüsse für Zymase günstig, welche die fermentative Proteolyse verlangsamen. So wird z. B. die Zymasegärung durch Hydroxylionen stimuliert, die Eiweißspaltung aber gehemmt; durch Wasserstoffionen wird im Gegenteil die Zymasegärung gehemmt und der Eiweißabbau befördert.<sup>1)</sup> Im Anschluß daran ergab es sich, daß primäre Phosphate den Zuckerabbau hemmen und den Eiweißabbau stimulieren, während sekundäre Phosphate eine Steigerung der Zymasegärung und Hemmung der Proteolyse bewirken.<sup>2)</sup> Neutralsalze hindern im allgemeinen die Zymasegärung und begünstigen die Proteolyse.<sup>3)</sup> Dies wurde namentlich für  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{KNO}_3$  durch die Versuche von O. Grigoriew und T. Gromow<sup>4)</sup> ausführlich erläutert. Bei einer Temperatur von etwa  $34^\circ$  wird die Eiweißspaltung bedeutend gesteigert und im Zusammenhange damit die Zuckerspaltung herabgesetzt.<sup>5)</sup>

Diese kurze Zusammenfassung der experimentell begründeten Tatsachen<sup>6)</sup> zeigt, daß die meisten Einflüsse von äußeren Faktoren sowohl den Zuckerabbau, als den Eiweißabbau berühren. Auf Grund dieser Beobachtung könnte man erwarten, daß Zinkchlorid eine bedeutende Steigerung der Eiweißspaltung bewirkt, da die  $\text{CO}_2$ -Produktion bei der Zymasegärung durch  $\text{ZnCl}_2$  ungemein stark herabgesetzt wird. In der

<sup>1)</sup> E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, S. 140 und 318 (1903).

<sup>2)</sup> N. Iwanoff, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. 1, S. 230 (1912).

<sup>3)</sup> E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, l. c., S. 165 u. 315.

<sup>4)</sup> O. Grigoriew und T. Gromow, Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 307 und 324 (1904).

<sup>5)</sup> A. Petruschewsky, Travaux de la Soc. des natur. de Saint-Pétersbourg, Bd. 37, Heft 1.

<sup>6)</sup> In der vorstehend erwähnten Arbeit von Grigoriew und Gromow sind noch andere Beispiele dieser Art zu finden.

vorliegenden Arbeit wurde die Einwirkung von Zinkchlorid auf den Eiweißabbau in Dauerhefe untersucht. Sämtliche Versuche wurden mit «trockener Dauerhefe nach v. Lebedew»<sup>1)</sup> bei Zimmertemperatur ausgeführt. Ein jeder Versuchskolben wurde mit etwa 1 g lufttrockener Hefe, 5 ccm Wasser und 4 Tropfen Toluol versetzt. In einzelnen Versuchen wurden außerdem verschiedene Mengen von Zinkchlorid und Rohrzucker verwendet. Der Gesamtstickstoff wurde nach Kjeldahl, der Eiweißstickstoff nach Stutzer ermittelt.

Die Bestimmungen des Gesamt- und Eiweißstickstoffs in dem für unsere Versuche verwendeten Präparat von Dauerhefe ergaben folgende Resultate:

Gesamtstickstoff				Eiweißstickstoff			
Hefe in g	N in mg	N in %	N in % im Mittel	Hefe in g	N in mg	N in %	N in % im Mittel
0,9981	94,7	9,49	} 9,48	1,0001	76,6	7,66	} 7,62
0,9983	94,9	9,50		0,9995	77,1	7,71	
0,9984	95,0	9,52		1,0004	76,1	7,60	
1,0004	95,0	9,50		1,0004	75,1	7,50	
1,0001	94,2	9,41		1,0001	76,2	7,62	

### Versuch I.

6 Kontrollportionen zu je 1 g Dauerhefe und 5 ccm Wasser und 6 Versuchsportionen zu je 1 g Dauerhefe, 5 ccm Wasser und 0,03 g  $ZnCl_2$ <sup>2)</sup> wurden ruhig stehen gelassen. Nach Ablauf von 2, 4 und 6 Tagen wurden je 2 Kontrollportionen und 2 Versuchsportionen analysiert.

<sup>1)</sup> Wir haben uns vergewissert, daß dieses Präparat aus lebenden, wachstumsfähigen Hefezellen besteht. Nach Aussaat einer minimalen Hefemenge auf sterilisierte Bierwürze-Gelatine entwickelten sich eigentümliche pfostenartige Kolonien. Bei Zusatz von Toluol war allerdings kein Wachstum möglich.

<sup>2)</sup> Das Verhältnis der Mengen von Dauerhefe, Wasser und Zinkchlorid war in diesem Versuche genau dasselbe wie in den ohne Zuckerzusatz ausgeführten Versuchen der I. und III. Mitteilung.

Zeit in Tagen	Eiweißstickstoff									
	Kontrollportionen (Wasser)					Versuchsportionen (Zinkchloridlösung)				
	Hefe- gewicht in g	N in mg	N in %	N in % im Mittel	Abge- spaltener Eiweiß-N in %	Hefe- gewicht in g	N in mg	N in %	N in % im Mittel	Abge- spaltener Eiweiß-N in %
2	1,0000	66,8	6,68	} 6,66	0,96	1,0006	58,5	5,85	} 6,03	1,59
2	1,0003	66,5	6,65			0,9999	62,2	6,22		
4	1,0000	53,3	5,33	} 5,35	2,27	1,0000	49,6	4,96	} 4,96	2,66
4	1,0001	53,7	5,37			1,0003	49,7	4,97		
6	1,0000	43,3	4,33	} 4,48	3,14	1,0001	41,3	4,13	} 4,13	3,49
6	1,0003	46,4	4,64			1,0004	41,3	4,13		

## Versuch II.

Genauere Wiederholung des vorstehenden.

Zeit in Tagen	Eiweißstickstoff									
	Kontrollportionen (Wasser)					Versuchsportionen (ZnCl <sub>2</sub> )				
	Hefe- gewicht in g	Eiweiß-N		Abge- spaltener Eiweiß-N in % des Hefe- gewichts	Hefe- gewicht in g	Eiweiß-N		Abge- spaltener Eiweiß-N in % des Hefe- gewichts		
2	0,9999	66,4	6,44	} 6,57	1,05	1,0005	58,3	5,82	} 5,81	1,81
2	1,0000	65,1	6,51			1,0000	58,1	5,81		
4	1,0001	53,3	5,33	} 5,36	2,26	1,0000	43,2	4,32	} 4,38	3,24
4	0,9999	53,8	5,38			1,0003	44,4	4,44		
6	1,0000	37,0	3,70	3,70	3,92	1,0002	31,9	3,19	} 3,07	4,55
6	—	—	—	—	—	0,9998	29,6	2,96		

Aus den beiden Versuchen ist ersichtlich, daß bei Abwesenheit von Zucker eine Beförderung der Eiweißspaltung durch Zinkchlorid stattfindet; der Einfluß von ZnCl<sub>2</sub> ist jedoch überraschend gering: aus den in der ersten Mitteilung<sup>1)</sup> ver-

<sup>1)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 130 (1912). — Vgl. auch die vorstehende IV. Mitteilung.

öffentlichten Versuchen ist einleuchtend, daß die  $\text{CO}_2$ -Produktion von Dauerhefe durch Zinkchlorid äußerst stark gehemmt wird. Wir wollen aber noch darauf aufmerksam machen, daß  $\text{ZnCl}_2$  nur bei Abwesenheit von Zucker den Eiweißabbau stimuliert. Findet jedoch gleichzeitig Zuckerabbau statt, so wird die Eiweißspaltung durch Zinkchlorid sogar etwas gehemmt, wie es aus folgenden Versuchen zu ersehen ist.

## Versuch III.

6 Kontrollportionen zu je 1 g Dauerhefe, 1 g Rohrzucker und 5 ccm Wasser und 6 Versuchsportionen zu je 1 g Dauerhefe, 1 g Rohrzucker, 0,03 g Zinkchlorid und 5 ccm Wasser<sup>1)</sup> wurden ruhig stehen gelassen. Nach Ablauf von 2, 4 und 6 Tagen wurden je 2 Kontrollportionen und 2 Versuchsportionen analysiert.

Zeit in Tagen	Eiweißstickstoff									
	Kontrollportionen					Versuchsportionen				
	Hefe- ge- wicht in g	N in mg	N in % vom Hefe- ge- wicht	N in % im Mittel	Abge- spaltener Eiweiß-N in % vom Hefe- gewicht	Hefe- ge- wicht in g	N in mg	N in % vom Hefe- ge- wicht	N in % im Mittel	Abge- spaltener Eiweiß-N in % vom Hefe- gewicht
2	1,0000	68,2	6,82	} 6,89	0,73	1,0000	70,2	7,02	} 7,02	0,60
2	0,9999	69,7	6,97			1,0002	70,2	7,02		
4	0,9999	55,8	5,58	} 5,69	1,93	1,0000	62,4	6,24	} 6,31	1,31
4	1,0001	58,0	5,80			0,9998	63,8	6,38		
6	1,0000	48,6	4,86	} 4,76	2,86	0,9996	54,7	5,47	} 5,36	2,26
6	1,0000	46,6	4,66			1,0003	52,4	5,24		

<sup>1)</sup> Das Verhältnis der Mengen von Dauerhefe, Zucker, Zinkchlorid und Wasser ist genau dasselbe wie in denjenigen Versuchen der Mitteilung I, welche die größte Ausbeute an Acetaldehyd ergaben.

## Versuch IV.

Genauere Wiederholung des vorstehenden Versuches.

Zeit in Tagen		Eiweißstickstoff									
		Kontrollportionen					Versuchsportionen (ZnCl <sub>2</sub> )				
		Hefe- ge- wicht in g	N in mg	N in % vom Hefe- ge- wicht	N in % im Mittel	Abge- spaltener Eiweiß-N in % vom Hefe- gewicht	Hefe- ge- wicht in g	N in mg	N in % vom Hefe- ge- wicht	N in % im Mittel	Abge- spaltener Eiweiß-N in % vom Hefe- gewicht
2	1,0001	72,4	7,23	} 7,29	0,33	0,9996	72,2	7,22	} 7,22	0,40	
2	1,0005	73,5	7,35			1,0004	72,2	7,22			
4	0,9999	62,5	6,25	} 6,30	1,32	0,9996	65,9	6,60	} 6,67	0,95	
4	1,0001	63,5	6,35			1,0002	67,4	6,74			
6	0,9999	52,8	5,28	} 5,33	2,29	1,0001	58,0	5,80	} 5,86	1,76	
6	1,0000	53,8	5,38			1,0001	59,2	5,92			

## Versuch V.

Genauere Wiederholung der beiden vorstehenden Versuche.

Zeit in Tagen		Eiweißstickstoff									
		Kontrollportionen					Versuchsportionen (ZnCl <sub>2</sub> )				
		Hefe- ge- wicht in g	N in mg	N in % vom Hefe- ge- wicht	N in % im Mittel	Abge- spaltener Eiweiß-N in % vom Hefe- gewicht	Hefe- ge- wicht in g	N in mg	N in % vom Hefe- ge- wicht	N in % im Mittel	Abge- spaltener Eiweiß-N in % vom Hefe- gewicht
2	1,0003	71,1	7,11	} 7,21	0,41	1,0004	72,1	7,20	} 7,16	0,46	
2	1,0004	73,1	7,30			1,0000	71,1	7,11			
4	1,0001	60,5	6,05	} 6,10	1,52	1,0004	62,2	6,22	} 6,18	1,44	
4	1,0002	61,4	6,14			1,0000	61,4	6,14			
6	1,0004	53,7	5,37	} 5,40	2,22	1,0003	54,0	5,40	} 5,52	2,10	
6	1,0004	54,3	5,42			1,0004	56,5	5,65			

In Gegenwart von Zucker wird der Eiweißabbau durch Zinkchlorid nicht befördert, sondern vielmehr etwas herabgesetzt. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß in Gegen-

wart von Zinkchlorid die Zuckerspaltung erheblich verlangsamt wird; infolgedessen ist nach 4 Tagen die hemmende Wirkung von Zucker auf die Proteolyse stärker in der mit  $ZnCl_2$  versetzten Versuchsportion. Auch übt der in Gegenwart von  $ZnCl_2$  entstehende Acetaldehyd nach den Angaben von L. Iwanoff<sup>1)</sup> eine hemmende Wirkung auf die Eiweißspaltung aus. In folgenden Versuchen wurde der Zuckergehalt auf 40% gesteigert: hierbei ist bei demselben Gehalt an  $ZnCl_2$  der Unterschied zwischen der Kontroll- und Versuchsportion noch schärfer als in 20%igen Zuckerlösungen.

## Versuch VI.

4 Kontrollportionen zu je 1 g Dauerhefe, 2 g Rohrzucker und 5 ccm Wasser. 4 Versuchsportionen zu je 1 g Dauerhefe, 2 g Rohrzucker, 0,03 g Zinkchlorid und 5 ccm Wasser. Nach Ablauf von 4 und 6 Tagen wurden je 2 Kontrollportionen und 2 Versuchsportionen analysiert.

Zeit in Tagen	Eiweißstickstoff									
	Kontrollportionen					Versuchsportionen ( $ZnCl_2$ )				
	Hefegewicht in g	N in mg	N in % vom Hefegewicht	N in % im Mittel	Abgespaltenes Eiweiß-N in % vom Hefegewicht	Hefegewicht in g	N in mg	N in % vom Hefegewicht	N in % im Mittel	Abgespaltenes Eiweiß-N in % vom Hefegewicht
4	1,0000	68,4	6,84	} 6,96	0,66	1,0004	73,6	7,36	} 7,40	0,22
4	1,0002	70,8	7,08			1,0001	74,4	7,43		
6	0,9999	63,4	6,34	} 6,37	1,25	1,0003	72,9	7,29	} 7,37	0,25
6	1,0000	64,1	6,41			0,9998	74,5	7,45		

Die Mengen des abgespaltenen Eiweißstickstoffes der Versuchsportionen liegen fast innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler. Der folgende Versuch ergab vollkommen übereinstimmende Resultate.

<sup>1)</sup> L. Iwanoff, Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 464 (1904).

## Versuch VII.

Wiederholung des vorstehenden Versuches.

Zeit in Tagen	Eiweißstickstoff									
	Kontrollportionen					Versuchsportionen (ZnCl <sub>2</sub> )				
	Hefe- ge- wicht in g	N in mg	N in %	N in % im Mittel	Abge- spaltener N in %	Hefe- ge- wicht in g	N in mg	N in %	N in % im Mittel	Abge- spaltener N in %
4	1,0000	69,9	6,99	} 7,01	0,61	1,0004	74,2	7,42	} 7,42	0,20
4	1,0000	70,2	7,02			1,0002	74,2	7,42		
6	1,0001	64,1	6,41	} 6,37	1,25	1,0000	74,6	7,46	} 7,42	0,20
6	1,0002	63,4	6,34			0,9998	73,8	7,38		

Es ist also ersichtlich, daß im Verlaufe von 4 Tagen in Gegenwart von Zinkchlorid nur 0,2% Eiweißstickstoff abgespalten wurde; während der beiden nachfolgenden Tage hat keine Eiweißspaltung stattgefunden; im ganzen war also praktisch kein Eiweißabbau zu verzeichnen. Bei dieser Gelegenheit wollen wir darauf hinweisen, daß unter den im letzten Versuche beibehaltenen Verhältnissen eine Bildung von Acetaldehyd erfolgt. Dies zeigt, daß die Aldehydproduktion mit der Eiweißspaltung nicht zusammenhängt und also nicht etwa auf eine eigentümliche Verarbeitung der bei der Eiweißhydrolyse auftretenden Aminosäuren zurückzuführen ist. Übrigens haben die in III. Mitteilung<sup>1)</sup> veröffentlichten Versuche dargetan, daß die Produktion von Acetaldehyd nur bei Zuckervergärung stattfindet.

Merkwürdig ist der Umstand, daß nach Zusatz von größeren ZnCl<sub>2</sub>-Mengen (0,06 bzw. 0,12 g) die Geschwindigkeit der Eiweißspaltung nicht verändert wird, obwohl hierbei die alkoholische Gärung bedeutend stärker gehemmt wird als bei Zusatz von 0,03 g Zinkchlorid.<sup>2)</sup> Im folgenden Versuche war der ZnCl<sub>2</sub>-

<sup>1)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 93 (1913).

<sup>2)</sup> In der vorstehenden IV. Mitteilung wird dargetan, daß bei Zusatz von 0,06 g ZnCl<sub>2</sub> auf je 1 g Hefe die CO<sub>2</sub>-Produktion etwa zehnmal geringer ist, als bei Zusatz von 0,03 g ZnCl<sub>2</sub>. Bei Zusatz von 0,12 g ZnCl<sub>2</sub> auf je 1 g Hefe wird die alkoholische Gärung vollkommen eingestellt.

Zusatz zwei- bzw. viermal größer als in den vorstehenden Versuchen.

### Versuch VIII.

A. 4 Kontrollportionen zu je 1 g Dauerhefe, 1 g Rohrzucker und 5 ccm Wasser.

B. 4 Versuchsportionen zu je 1 g Dauerhefe, 1 g Rohrzucker, 0,06 g Zinkchlorid und 5 ccm Wasser.

C. 4 Versuchsportionen zu je 1 g Dauerhefe, 1 g Rohrzucker, 0,12 g Zinkchlorid und 5 ccm Wasser.

Nach Ablauf von 4 und 6 Tagen wurden zwei Portionen je einer Serie analysiert.

Zeit in Tagen	Eiweißstickstoff														
	Kontrollportionen A (Wasser)					Versuchsportionen B (0,06 g ZnCl <sub>2</sub> )					Versuchsportionen C (0,12 g ZnCl <sub>2</sub> )				
	Hefe- ge- wicht in g	N in mg	N in %	N in % im Mittel	Abge- spalt. Ei- weiß- N in %	Hefe- ge- wicht in g	N in mg	N in %	N in % im Mittel	Abge- spalt. Ei- weiß- N in %	Hefe- ge- wicht in g	N in mg	N in %	N in % im Mittel	Abge- spalt. Ei- weiß- N in %
4	1,0004	63,4	6,34	} 6,39	1,23	1,0003	65,0	6,49	} 6,49	1,13	1,0004	64,0	6,39	} 6,44	1,18
4	1,0001	64,4	6,44			1,0000	65,0	6,50			1,0001	64,8	6,48		
6	1,0002	53,1	5,31	} 5,35	2,27	1,0000	58,3	5,83	} 5,82	1,80	0,9998	58,4	5,84	} 5,94	1,68
6	0,9998	54,0	5,40			1,0000	58,1	5,81			1,0001	60,5	6,05		

Es ergab sich also, daß bei Zusatz von 0,06 g bzw. 0,12 g ZnCl<sub>2</sub> dieselbe Menge von Eiweißstickstoff abgespalten wird, als in Gegenwart von 0,03 g ZnCl<sub>2</sub> bei sonst gleichen Verhältnissen.

Alle vorstehend beschriebenen Versuche zeigen also, daß die fermentative Eiweißspaltung durch Zinkchlorid nicht wesentlich beeinflusst wird. Bei Abwesenheit von Zucker findet eine geringe Steigerung der Proteolyse statt, die wahrscheinlich nur auf die saure Reaktion von ZnCl<sub>2</sub> zurückzuführen ist; in Zuckerlösungen ist im Gegenteil eine unbedeutende Hemmung der Eiweißspaltung zu verzeichnen. Auch diese Beeinflussung ist offenbar eine indirekte: in 20%igen Zuckerlösungen tritt sie in der Tat nur nach Ablauf von 4 Tagen deutlich hervor.

Da nun  $\text{ZnCl}_2$  die Zuckerspaltung stark hemmt, so ist nach 4 Tagen der Zuckergehalt der mit Zinkchlorid versetzten Portion immer größer als in der Kontrollportion; größere Zuckermengen verlangsamen aber bekanntlich die fermentative Eiweißspaltung. Diese Erklärung ist um so wahrscheinlicher, als die Hemmung der Eiweißspaltung durch Zinkchlorid noch viel schärfer in 40%igen Zuckerlösungen ausgeprägt ist, während eine Steigerung der  $\text{ZnCl}_2$ -Menge bei unverändertem Zuckergehalt ohne Einfluß bleibt.

Diese Ergebnisse beweisen, daß die starke Hemmung der Zymasegärung durch Zinkchlorid nicht davon herrührt, daß die Energie der antagonistischen Proteolyse größer wird und infolgedessen eine schnellere Zerstörung der Zymase eintritt. Es liegt vielmehr die Annahme nahe, daß die Wirkung von Zinkchlorid auf die alkoholische Gärung sich von den im Anfang der vorliegenden Mitteilung erwähnten Einflüssen prinzipiell unterscheidet: diese sind im allgemeinen auf eine Steigerung der Eiweißspaltung zurückzuführen, während Zinkchlorid eine direkte Wirkung auf Gärungsfermente ausübt.

---