

Über die Rolle des Glykogens bei der Gärung durch lebende Hefe.

Von
Hans Euler.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 15. Januar 1914.)

Bezüglich der Zwischenprodukte, welche bei der alkoholischen Gärung der Kohlenhydrate auftreten, haben die Forschungen der letzten Jahre zwar noch keine endgültigen Resultate, aber wohl einige, z. T. sehr wertvolle Anhaltspunkte gebracht. Man kann dieselben etwa in folgender Weise zusammenfassen.

1. Am Abbau der vergärbaren Zuckerarten beteiligen sich Phosphate, indem dieselben organische Kohlenhydratphosphorsäureester bilden (Iwanoff, Harden und Young).

2. Diese Kohlenhydrate entstehen nicht direkt aus den unveränderten Zuckern, sondern erst nach einem noch nicht näher bekannten Umwandlungsprozeß desselben.

3. Beim Abbau der Zuckerarten entstehen Stoffe mit 3 Kohlenstoffatomen, vermutlich von der Zusammensetzung $C_3H_6O_3$; in Zusammenhang mit diesen steht eine Ketonssäure (Brenztraubensäure), aus welcher durch eine Carboxylase Kohlenensäure abgespalten werden kann (Neuberg).

Während die letzte Phase der Gärung durch die Arbeiten von Neuberg wesentlich geklärt worden ist, wissen wir über den Beginn der Gärungsreaktion chemisch noch so gut wie gar nichts.

Hier erheischt in erster Linie die Tatsache eine Erklärung, daß zu Anfang der Gärung mehr Zucker verschwindet, als Kohlensäure auftritt.

Das Schicksal des Zuckers beim Abbau durch Enzyme wird um so interessanter, als bekanntlich eine große Reihe von Tatsachen dafür spricht, daß die Atmung bzw. die Zuckerverbrennung in höheren Organismen in derselben Weise beginnt

wie die Gärung. Auch bei der Zuckerverbrennung im Pflanzen- und Tierkörper sind aller Wahrscheinlichkeit nach Kohlenhydratphosphorsäureester beteiligt und ich habe bereits in einigen vorhergehenden Arbeiten auf den Einfluß aufmerksam gemacht, welchen möglicherweise die Phosphate bei den Anomalien des Zuckerumsatzes im Tierkörper (also bei Diabetes usw.) besitzen.¹⁾

Nun ist von Tierphysiologen bereits vielfach die Auffassung geäußert worden, daß das erste Schicksal des Zuckers im Organismus höherer Tiere in der Bildung von Glykogen besteht und obwohl es scheinen kann, daß durch einen solchen anfänglichen Aufbau der Kohlenhydrate sich der Stoffwechsel sehr kompliziert gestaltet, so sprechen doch zahlreiche Umstände für eine solche Annahme.

Nun ist daran zu erinnern, daß vor einiger Zeit Grüss²⁾ die Hypothese aufgestellt hat, daß auch bei der alkoholischen Gärung in der Hefe der Zucker zunächst in Glykogen verwandelt wird. Diese Annahme hat bekanntlich wenig Beachtung gefunden, sie ist in fast allen neueren Übersichten und Monographien, welche die alkoholische Gärung behandeln, entweder übergangen oder jedenfalls nicht weiter diskutiert worden. Dies erklärt sich durch den Umstand, daß die Tatsachen, durch welche Grüss selbst seine Annahme zu stützen suchte, wenig beweisend sind.

In der letzten Zeit habe ich einige Versuche angestellt, welche für die Richtigkeit der Grüssschen Hypothese zu sprechen scheinen, und es dürfte angebracht sein, die genannte Annahme wieder einer eingehenden Prüfung zu unterziehen. Eine solche Arbeit habe ich auch unternommen im Zusammenhang mit früheren Untersuchungen, welche ich mit einigen Mitarbeitern über die Differenz zwischen der bei der Gärung verschwindenden Menge Zucker und der gleichzeitig auftretenden Kohlensäure angestellt habe.³⁾

¹⁾ Diese Zeitschrift. Bd. 79, S. 375, 1912.

²⁾ Zeitschrift f. d. ges. Brauw., Bd. 27, 1904.

³⁾ Euler und Berggren, Zeitschrift f. Gärungsphysiologie, Bd. 1, S. 203, 1912. — Euler und Johansson, Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 347, 1912. — Euler und Hille, Zeitschrift f. Gärungsphysiologie, Bd. 3, S. 235, 1913.

Bezüglich einer solchen Differenz in lebender Hefe lag bis zu Beginn unserer Studien nur eine gelegentliche Bemerkung von Jodlbauer¹⁾ vor. Aus den Versuchen von Johansson habe ich geschlossen, daß diese Differenz auf der Bildung eines Zwischenprodukts oder Umwandlungsprodukts des Zuckers beruht, über dessen Natur wir uns nicht weiter ausgesprochen haben. Wir haben versucht, über die Drehung des auftretenden Produkts Aufschlüsse zu erhalten, konnten aber zu keinem definitiven Resultate kommen.

Ein ähnlicher Effekt war bei der zellfreien Gärung durch Hefepreßsaft mehrfach beobachtet worden und zwar wohl zuerst von A. Macfadyen, Harris Morris und S. Rowland,²⁾ später von Harden und Young.³⁾

Schließlich sind die Versuche von Harden und Young durch Buchner und Meisenheimer⁴⁾ wiederholt worden, welche durch dieselben das von M. Cremer⁵⁾ zuerst behauptete Vorkommen eines aufbauenden Enzymes im Hefepreßsaft zahlenmäßig festlegten.

Daß sich Glykogen in der Hefe in beträchtlichen Mengen bildet, ist eine altbekannte und nicht zu bezweifelnde Tatsache. Ebenso ist längere Zeit bekannt, daß das Glykogen in der Hefe großen Schwankungen von 5—35% unterworfen ist. Viel weniger genau steht fest, in welcher Weise Glykogenbildung und Kohlensäureentwicklung bzw. Zuckerverlust in den die lebende Hefe umgebenden Lösungen zusammenhängen und wir haben dieser Beziehung deshalb unsere Aufmerksamkeit gewidmet. Gleichzeitig war natürlich zu fragen, ob und in welchem Grade zwischen dem Zucker und dem Glykogen stehende höhere Kohlenhydrate gebildet werden.

Wenn nach der Grüssschen Hypothese die gesamte Gärung über das Glykogen geht, so gewinnt ja die Annahme

¹⁾ Zeitschrift f. d. Rübenzuckerindustrie, Bd. 25, S. 308, 1888. — Ich verdanke einen Sonderdruck dieser Abhandlung Herrn Professor Dr. Lintner.

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.

an Wahrscheinlichkeit, daß die Zwischenprodukte, welche die Differenz zwischen dem verschwundenen Zucker und der auftretenden Kohlensäure erklären, Stoffe sind, die zwischen den Hexosen und dem Glykogen liegen. Mit Studien über diese Kohlenhydrate ist im hiesigen Laboratorium Herr Mag. Kullberg beschäftigt.

Experimentelles.

Die Glykogenbestimmung in der Hefe ist in neuerer Zeit von Schönfeld und Krampf in ausgezeichnete Weise ausgearbeitet worden auf Grund der Pflügerschen Methode. Das Verfahren dieser Forscher ist zweifellos für Hefeuntersuchung das genaueste und geeignetste und es ist höchstens daran auszusetzen, daß es, wenn es sich um zahlreiche Bestimmungen handelt, ziemlich zeitraubend ist. Selbst haben wir das Verfahren von Schönfeld und Krampf in folgender Weise angewandt: 10 g gewaschene Hefe wurden in 30 ccm 60%iger Kalilauge eingetragen und darin 3 Stunden lang erhitzt. Nach dieser Zeit wird abgekühlt, mit ganz wenig Wasser verdünnt und das Glykogen mit 200 ccm 96%igem Alkohol gefällt. Nach mindestens 10stündigem Stehen kann das Glykogen durch einen Gooch-Tiegel abgezogen werden und wird hierauf mit Alkohol und Äther gewaschen. Das reine Glykogen wird hierauf in heißem Wasser gelöst, filtriert und die Lösung mit Salzsäure neutralisiert. Nachdem man die Lösung auf ein bestimmtes Volumen gebracht hat, versetzt man etwa $\frac{1}{10}$ von der Lösung mit starker Salzsäure und hydrolysiert das Glykogen auf dem Wasserbade. Nach dem Abkühlen der Lösung bestimmt man den Zucker als Glukose nach der Methode von Pavy oder Bertrand.

Die Bestimmung der in der Hefe durch Wasser extrahierbaren reduzierenden Stoffe, auf welche wir später zurückkommen, wurde ebenfalls nach der Pavyschen Methode ausgeführt. Im übrigen ist über die Anstellung der Versuche wenig zu sagen, ich kann auf die erwähnte Mitteilung von mir

¹⁾ Wochenschr. f. Brauerei, Bd. 28, S. 157, 1911.

und D. Johansson verweisen. Die Bestimmung der Kohlensäure geschah stets volumetrisch; die meisten Bestimmungen wurden wieder bei 30° ausgeführt.

Versuche.

Unsere aus der Brauerei bezogene, sorgfältig in der Kälte gewaschene Hefe besaß einen mittleren Glykogengehalt von 10%.

Der Phosphorsäuregehalt war hingegen ziemlich hoch, nämlich 4,1% P_2O_5 . Der Gesamtstickstoffgehalt betrug 61%.

Unsere ersten Versuche galten einer Vervollständigung der früher von Euler und Johanssen über die Werte $\Delta-C$ (Δ = prozentischer Drehungsrückgang, C prozentische Menge der entwickelten Kohlensäure) aufgestellten Beziehungen mit Angaben über den Verbrauch von Zucker zur Glykogenbildung und eventuell zur Bildung höherer Kohlenhydrate.

Unsere Versuche wurden also jetzt mit größeren Mengen angestellt, in der Regel mit je 40 oder 80 g gepreßter Hefe. Da die Glykogenumwandlung in der Hefe ein ganz auffallend schnell verlaufender Reaktionskomplex ist, so muß bei der Probenahme große Sorgfalt darauf verwendet werden, daß die Hefe wirklich in dem Zustand zur Analyse kommt, welcher dem gewünschten Zeitpunkt entspricht. Wir haben nach einigen mißlungenen Versuchen, die Hefe mit Salz aus der gärenden Lösung auszufällen, die Zellen durch Zusatz von Alkohol aus der gärenden Flüssigkeit ausgeschieden, was ein schnelles Arbeiten gestattet und gleichmäßige Resultate ergeben hat.

Anfänglich haben wir die Hefe vor der Glykogenbestimmung plasmolysiert und zwar mit Glycerin, um einer vollständigen Gewinnung des Glykogens sicher zu sein. Indessen haben wir bei dieser Methodik so auffallende Ergebnisse erhalten, besonders stets einen viel kleineren Glykogengehalt als aus den intakteren Zellen, daß wir bald diese Arbeitsweise verlassen haben, umsomehr, als sich gezeigt hat, daß auch aus den unverletzten Zellen das Glykogen sehr vollständig ausgezogen werden kann.

Die Bestimmung der reduzierenden Substanzen geschah in der Weise, daß die Hefe direkt in kochendes Wasser eingeführt wurde, worauf unter Zusatz eines gleichen Volumens Eiswassers sofort abgekühlt wurde. Hierauf wurde abgessen und die Extraktion mit Wasser von 30° noch einmal ausgeführt. Eine dritte Extraktion zeigte, daß alle löslichen reduzierenden Stoffe entfernt worden waren.

Wir geben nun zunächst unsere Resultate in bezug auf den Glykogengehalt der Hefe an, und zwar eine ältere Versuchsreihe. Die Hefe gährte in einer 10%igen Glukoselösung.

Tabelle 1.

Gärungszeit Minuten	ccm verbrauchte Fehlingsche Lösung	g Glykogen
0	43,2	0,253
30	39,6	0,232
60	37,3	0,209
90	35,1	0,200
120	35,3	0,207
180	38,1	0,220

Die Beziehung zu der Kohlensäureentwicklung, der Drehungsänderung und der Reduktionsänderung geht aus folgenden Versuchen hervor:

Tabelle 2.

Versuch	Gärungszeit in Stunden	Entwickelte CO ₂ in %	Drehungs- änderung in %	Reduktions- änderung in %	Glykogen aus Glukose in %
1	0,5	19	14	13	28
1	2	36	58	54	21
2	0,5	12	20,2	17	30
2	1,0	19	28	25	22
2	2,0	25	42	36	20

Einige weitere Versuche führen wir über den Zusammenhang zwischen Reduktionsrückgang und Drehungsrückgang an (Versuche von B. Gustafson).

Tabelle 3.

Gärungszeit in Minuten	Entwickelte Kohlensäure in %	Drehungs- änderung in %	Reduktions- änderung in %
180	8,1	18,4	17,9
240	10,2	21,9	17,0
360	20	42,1	33,3

Die Berechnung der prozentischen Reduktionsänderung wird dadurch erschwert, daß die Kohlenhydratphosphorsäureester bei der relativ leicht erfolgenden Spaltung stark reduzierende Stoffe liefern.

Zu betonen ist immerhin, daß, obwohl Glykogen verbraucht wird, die prozentische Reduktionsänderung kleiner ist als die Drehungsänderung. Diese Tatsache, welche als Anzeichen für das Auftreten optisch aktiver Zwischenprodukte gedeutet werden könnte, wird näher untersucht.

Man kann nun zuerst eine Berechnung darüber anstellen, welcher Menge Glukose das verschwundene Glykogen entspricht. Verbraucht wurden bei unseren Versuchen durchschnittlich von 1 g Hefe (berechnet als Trockenhefe) 0,08 g Glykogen. Es wurden also etwa 0,09 g Glukose aus der Lösung entfernt. Dies entspricht einem Mehrverbrauch an Glukose von rund 1%.

Der Umstand, daß die Differenz $\Delta - C$ durchaus nicht mit der Menge der angewandten Hefe proportional ist, vielmehr beinahe davon unabhängig, zeigt deutlich, daß keineswegs diese ganze Differenz auf Rechnung der Glykogenbildung zu setzen ist.

Tabelle 4.

Minuten	Angewandte Hefenmenge per l	Entwickelte Kohlensäure in %	Drehungs- änderung in %	$\Delta - C$
120	20	16	29	13
250	10	17,4	27,4	10
60	40	15,2	27,3	12,1

Falls Glykogen als Zwischenprodukt bei der Gärung auftritt, so ist es jedenfalls nicht dasjenige Zwischenprodukt, welches die Differenz $\Delta - C$ verursacht.

Schließlich sei auch noch auf die Tatsache aufmerksam gemacht, daß etwa die gleichen Verhältnisse, nur mit geringen quantitativen Abweichungen auftreten, wenn statt Glukose Fruktose und Mannose verwendet wird. Dieser Befund scheint mir deswegen interessant, weil er zeigt, daß, wenn die Vergärung über das Glykogen als Zwischenprodukt verläuft, eine sehr schnelle Isomerisation der Hexosen eintritt.

Tabelle 5.

1 g Hefe in 20 ccm 10%iger Zuckerlösung.

Minuten	Zucker	Entwickelte Kohlensäure in %	Drehungs- änderung in %	$\Delta-C$
120	Fruktose	28,2	36,3	8,1
175	"	37,3	47,2	9,9
90	Mannose	19,5	30,5	11,0

Wie bereits betont, haben wir uns über die Art des Produktes, welches die Differenz $\Delta-C$ veranlaßt, niemals ausgesprochen, auch nicht darüber, ob dieses Produkt selbst eine Drehung besitzt. «Für den Fall» — schrieben wir in dieser Zeitschrift, Bd. 76, S. 353 — «daß diese Differenz nur durch die Bildung eines inaktiven Produktes bei 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.»

Aus dem zeitlichen Verlauf der Glykogenbildung kann einstweilen noch kein sicherer Schluß auf die Rolle des Glykogens als Zwischenprodukt der Gärung gezogen werden. Die Differenz $\Delta-C$ kann nicht vom Glykogen herrühren.

Meinen Mitarbeitern bei diesen Versuchen, Dr. A. Fodor, Mag. B. Gustafson u. Th. Berggren, danke ich für ihre Unterstützung.

Anm. b. d. Korrektur: Nach Drucklegung dieser Mitteilung konnte ich von den Arbeiten von Harden u. Young (Biochem. J., Dezemberheft) und Isaac (Diese Zeitschr., Bd. 89, S. 78) Kenntnis nehmen, und werde demnächst auf dieselbe zurückkommen.