

# Über die Phosphatwirkung auf die alkoholische Gärung bei verschiedenen OH'-Konzentrationen.

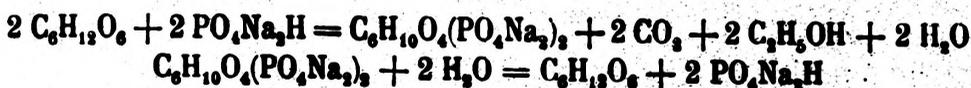
Von

H. Euler und T. Tholin.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. Mai 1916.)

Die Phosphatwirkung bei der alkoholischen Gärung wird nach Harden und Young durch die folgenden Gleichungen zusammengefaßt:



Zu diesem Ergebnis sind die genannten Forscher durch ihre Studien an Hefepreßsaft gekommen, und auf dieses Material, also auf zellfreien (zellarmen) Preßsaft beziehen sich auch die folgenden Angaben Hardens und Youngs.<sup>1)</sup>

Fügt man ein Phosphat zu einer gärenden Mischung von Zucker und Hefesaft, so wechselt der Effekt mit der Konzentration des Phosphates und des Zuckers und mit der speziellen Beschaffenheit des Hefesaftes. Bei geringer Konzentration des Phosphates in Gegenwart von Überschuß von Glykose ist die hervorgerufene Beschleunigung so vorübergehend, daß keine genauen Messungen gemacht werden können. Sobald aber der Betrag des zugefügten Phosphates hinreichend groß wird, steigt die Entwicklung des Kohlendioxyds sehr schnell vom 5- zum 10-fachen Betrag und fällt dann rasch bis auf den ursprünglichen Wert. Steigert man die Konzentration des Phosphates noch weiter, so hält sich die maximale Geschwindigkeit, welche fast unmittelbar nach der Zufügung des Phosphates erreicht wird, während einer gewissen Zeit, bevor der Abfall beginnt;

<sup>1)</sup> Harden und Young, Proc. Roy. Soc., B 80, S. 299, 1908.

schreitet dann die Konzentration des Phosphates noch weiter fort, so wird das Maximum nach der Zugabe nur allmählich erreicht und die dazu erforderliche Zeit wächst mit der Konzentration des Phosphates.<sup>1)</sup>

Werden dann die Phosphatkonzentrationen noch größer, so wird der maximale Betrag geringer als derjenige, welcher mit niedrigeren Konzentrationen erreicht wird, und dieser Betrag fällt langsam ab. Die Konzentration des Phosphates, welches die höchste Gärungsgeschwindigkeit hervorruft, wechselt sehr erheblich mit der Beschaffenheit des Hefesaftes. Diese Verhältnisse gehen sehr deutlich aus Kurven hervor, welche von Harden für die verschiedenen Phosphatkonzentrationen zusammengestellt sind.<sup>2)</sup>

In diesem Zusammenhang ist noch zu erwähnen, daß in bezug auf die Lage und die Größe des hier besprochenen Optimums der Phosphatkonzentrationen auch die Natur des Zuckers eine nicht unwesentliche Rolle spielt, wobei die Fruktose von den beiden anderen gärfähigen Hexosen, der Glykose und Mannose, in folgenden Punkten abweicht. Die Optimalkonzentration des Phosphates ist bei der Fruktose größer und der maximale Gärungsbetrag, welcher überhaupt erreicht werden kann, ist bedeutend höher.

Die Gültigkeit der eingangs erwähnten Harden-Youngschen Gleichung während des ganzen Gärungsvorgangs ist von Euler und Johansson<sup>3)</sup> untersucht worden. Die Gleichung gilt für lebende Hefe in einem gewissen Konzentrationsgebiet des Phosphates; außerhalb desselben treten Störungen auf. Da der Mechanismus der Gärung überhaupt noch nicht aufgeklärt ist, so konnten diese Einflüsse bis jetzt noch nicht gedeutet werden. Folgende Tatsachen haben Euler und Johansson in der genannten Mitteilung besonders hervorgehoben.

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

<sup>1)</sup> Harden und Young, Proc. Roy. Soc., B 80, S. 299, 1908.

<sup>2)</sup> Harden und Young, Proc. Roy. Soc., B 81, S. 336, 1909.

<sup>3)</sup> Euler und Johansson, Diese Zeitschrift, Bd. 85, S. 192, 1913.

Die mit der Veresterung verknüpfte Kohlensäureentwicklung wird durch überschüssiges Phosphat gehemmt und die so beeinflusste Gärung durch Fruktose beschleunigt. (Harden und Young.)

Neben dem Hexosediphosphat wird noch ein Triosemonophosphat gebildet.

Die enzymatische Hydrolyse des Kohlenhydratphosphorsäureesters wird durch Toluol stark gehemmt.

Zu diesen Ergebnissen kommt nun — um gleich das wesentliche Resultat dieser Mitteilung vorauszunehmen — ein neues, nämlich die Tatsache, daß die Phosphatwirkung nicht nur ihrem Grade, sondern sogar dem Sinne nach von der Konzentration der H- bzw. OH-Ionen abhängig ist. Erhält man nämlich die Konzentration der Hydroxylionen in der Lösung auf einem Wert, welche dem Farbumschlag des Phenolphthaleins entspricht, so erzeugt Zusatz von Phosphat innerhalb recht weiter Konzentrationsgrenzen nicht nur keine Beschleunigung des Gärungsvorgangs, sondern im Gegenteil eine Verzögerung.

Dieses ganze Gebiet ist bis jetzt noch auffallend wenig geklärt. Dem Einfluß der Hydroxylionen auf die Gärung an sich hat Hägglund<sup>1)</sup> eine Untersuchung gewidmet und wird im Anschluß daran seine experimentellen Studien, besonders unter Anwendung der elektrometrischen Methode fortsetzen.

Über den Einfluß der H- und OH-Ionen auf die Phosphatwirkung bei der Hefe ist bis jetzt noch wenig bekannt.

Bei der Darstellung des Kohlenhydratphosphorsäureesters setzt man am geeignetsten Dinatriumphosphat der Zuckerlösung zu, beginnt also mit alkalischer Reaktion, welche sich im Verlauf der Gärung abstumpft, aufhebt und schließlich in saure Reaktion übergeht.

Über die Einwirkung von Hydroxylionen auf das esterbildende Enzym, die Phosphatase, liegen die Angaben von Euler und Kullberg vor, nach welchen in Enzymlösung (also nicht in lebender Hefe) die Esterbildung durch eine Konzen-

<sup>1)</sup> E. Hägglund, Hefe und Gärung in ihrer Abhängigkeit von Wasserstoff- und Hydroxylionen. Sammlung Ahrens-Herz, Stuttgart, 1914.

tration von etwa  $10^{-5}$  stark beschleunigt wird. Bei welchen Konzentrationen das Optimum der Esterbildung liegt, wurde bei der erwähnten Arbeit nicht festgestellt. Harden und Young haben bei ihren Versuchen mit Hefepreßsaft meist Mischungen von primärem und sekundärem Phosphat angewandt (Proc. Roy. Soc., B 80, S. 310) in anderen Fällen rein sekundäres Phosphat (Proc. Roy. Soc., B 81, S. 343), sodaß also die Lösungen zu Anfang der Reaktion in der Regel neutral oder schwach alkalisch gewesen sein dürften.

### Versuche.

Die Vergärung geschah in geschlossenen Gefäßen von etwa 200 ccm Inhalt, durch welche ein Luftstrom geleitet werden konnte, welcher die bei der Gärung entwickelte Kohlensäure in Barytvorlagen überführte. In den Gefäßen befand sich 50 ccm reine 5%ige Glukoselösung (Kahlbaums reine kristallisierte Glukose) und 0,5 g frische untergärrige Hefe. Diese Lösung enthielt noch Phosphat in wechselnder Menge. Außerdem wurde zu der gärenden Lösung noch 1 ccm einer 0,01 prozentigen Phenolphthaleinlösung zugesetzt.

Das Gärungsgefäß war mit einem dreifach durchbohrten Gummiverschluß versehen; durch die eine Öffnung ging das zu einer feinen Spitze ausgezogene Verbindungsrohr zu einer Bürette, welche 0,5 norm. Kalilauge enthielt, durch die andere Öffnung wurde die Verbindung mit einer Barytvorlage hergestellt, welche eine bekannte Menge Barytlösung enthielt, die dritte Öffnung gestattete den Eintritt der von Kohlensäure befreiten Luft. Alle drei Wege konnten nach Bedarf abgesperrt werden.

Jeder Gärungsversuch wurde 2,5 Stunden lang fortgeführt; während des ganzen Versuches wurde ein schwacher Strom kohlensäurefreier Luft durch den Apparat gesogen. Durch successiven Zusatz von Kalilauge wurden die  $\text{OH}'$ - resp.  $\text{H}'$ -Ionen auf derjenigen Konzentration erhalten, welche dem Übergang des Phenolphthaleins von rot auf farblos entspricht, also nahe  $p_{\text{H}} = 10^{-8}$ . Nach der genannten Zeit wurde der Versuch durch Zusatz eines Überschusses von Kalilauge abgebrochen.

Die Verbindung zur Alkalibürette und zum Luftreinigungsapparat wurde unterbrochen, die Gärungsflasche wurde evakuiert und auf 50° erwärmt. Durch die Bürette ließ man nun 4 norm. Schwefelsäure zufließen, und trieb dann das freigemachte CO<sub>2</sub> durch einen Luftstrom in die Barytvorlage über. Die Kohlensäure wurde dann nach der Methode von Vesterberg<sup>1)</sup> bestimmt.

Bei Parallelversuchen mit anderen Indikatoren, welche in höherer H<sup>+</sup>-Ionenkonzentration ihre Farbe ändern, wurde die Kohlensäure volumetrisch in Quecksilberbüretten gemessen; die Gärungsgefäße im Thermostaten waren dann sowohl mit einer kapillaren Verbindung zu den Quecksilberbüretten als mit einer Alkalibürette verbunden.

Die Konstanthaltung der H<sup>+</sup>-Ionenkonzentration durch successive zufließendes Alkali könnte vielleicht unzweckmäßig erscheinen in Hinsicht auf die Möglichkeit, zu diesem Zweck Puffersubstanzen anzuwenden, wie sie besonders von Sørensen und Michaelis vorgeschlagen und untersucht worden sind. Indessen konnten für unsere Untersuchung gerade die sonst gebräuchlichsten und geeignetsten Puffer, Phosphate und Aminosäuren nicht verwendet werden, da beide die Gärung durch lebende Hefe in anderer Weise als durch Regulierung der H-Konzentration wesentlich beeinflussen; in erster Linie waren für uns die Phosphate ausgeschlossen, da gerade die Wirkung des Phosphations studiert werden sollte. Es blieb also nur eine ständige Kontrolle der Reaktion mittels der Indikatormethode oder durch elektrometrische Messung über. Es soll noch betont werden, daß das Zutropfen von Alkali zu der gärenden Lösung in der Weise geschah, daß eine merkbare Schädigung der Hefezellen nicht eintreten konnte.

Ferner wurde unsere Versuchsmethodik insofern geprüft, als festgestellt wurde, daß die von uns angewandten Indikatoren Phenolphthalein (in der oben angegebenen Konzentration), ferner Methylorange, Kongo und Lackmus (0,1 mg auf 100 ccm Lösung) unter unseren Versuchsbedingungen einerseits keine Giftwirkung auf lebende Hefe ausüben, andererseits durch lebende Hefe

<sup>1)</sup> Vesterberg, Zeitschr. für physik. Chem., Bd. 70, S. 551, 1910.

nicht selbst reduziert werden, wodurch eine größere Konzentration der Wasserstoffionen vorgetäuscht würde. Auch Adsorption dieser Indikatoren wurde nicht beobachtet.<sup>1)</sup>

Als Beispiel dafür, welche Alkalimengen während eines Versuches zugesetzt wurden, sei folgender Parallelversuch angeführt, bei welchem einerseits Phenolphthalein, andererseits Kongo als Indikator angewandt worden waren.

Minuten	10	20	30	45	60	90	120	150	180
0,5 norm. Alkali	0,8	1,2	2,6	3,5	4	5,2	6,0	7,1	8 ccm.

In dieser Weise wurde der Gärungsverlauf unter Zusatz der genannten 4 Indikatoren verglichen. Es ergab sich für unsere Hefe ein Maximum für die H<sup>+</sup>-Ionenkonzentration, welche dem Farbumschlag des Kongorotes entspricht, also etwa für die Konzentration 10<sup>-4</sup>. Die erhaltenen Zahlen werden später im Zusammenhang mit elektrometrischen Messungen mitgeteilt.

Im folgenden wollen wir die Versuche beschreiben, welche erhalten wurden, wenn die Gärungsflüssigkeit auf der H<sup>+</sup>-Konzentration gehalten wurde, welche dem Farbumschlag des Phenolphthaleins entspricht, und zwar bei Zusätzen verschiedener Mengen von Phosphat.

### Versuche.

Gärungstemperatur 20°.

Wir geben zunächst zwei Versuche mit Natriumphosphat wieder:

#### Versuch 1.

0,5 g frische Hefe.

Ohne Phosphat 0,0488 g CO<sub>2</sub>

Mit 2,5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,0246 g CO<sub>2</sub>.

#### Versuch 2.

Minuten	ccm zugesetzte 0,5 normale Natronlauge										g CO <sub>2</sub> nach 120 Min.
	10	20	30	40	50	60	70	80	100	120	
Ohne Phosphat	0,60	1,20	1,75	2,30	2,90	3,40	3,90	4,50	5,80	7,00	0,0488
Mit 2,5% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,60	1,30	1,52	1,63	1,70	1,76	2,05	2,23	2,90	3,70	0,0246

<sup>1)</sup> Vgl. Rohland u. Heyder, Kolloid. Zeitschr., Bd. 17, S. 139, 1915.

Es tritt also hier eine starke Erniedrigung durch Zusatz von Phosphat ein. Dieselbe beruht nicht auf einer Schädigung der Hefe durch Na-Ionen, wie die folgenden Versuche mit Kaliumphosphat zeigen.

Versuch 3.

Minuten	ccm zugesetzte 0,5 normale Natronlauge										g CO <sub>2</sub> nach 150 Min.
	10	20	30	40	50	60	80	100	120	150	
Ohne Phosphat	0,85	1,60	2,20	2,91	3,65	4,20	5,45	6,70	8,25	10,00	0,0594
Mit 2,5% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,50	3,05	3,25	3,55	4,06	4,40	4,92	5,87	7,00	8,50	0,0383

Versuch 4.

	Nach 150 Minuten entwickelt	
	ccm CO <sub>2</sub>	g CO <sub>2</sub>
Ohne Phosphat . . . . .	29,8	0,0523
Mit 2,5% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	18,2	0,0319

Daß es sich hier nicht um eine spezifische Wirkung auf die lebenden Zellen handelt, geht aus folgendem Versuch hervor, der mit getrockneter (Dauer-)Hefe angestellt ist.

Versuch 5.  
2 g getrocknete Hefe.

Minuten	ccm zugesetzte 0,5 normale Natronlauge										g CO <sub>2</sub> nach 150 Min.
	10	20	30	40	50	60	80	100	120	150	
Ohne Phosphat	2,05	3,70	4,00	4,20	4,25	4,28	4,48	4,58	5,20	6,11	0,0165
Mit 2,5% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,60	2,80	3,00	3,02	3,05	3,05	3,12	3,13	3,23	3,58	0,0099

Die Verzögerung der Gärung durch das Phosphat ist bei der Dauerhefe etwa ebenso groß wie bei der lebenden Hefe, wie die folgende Zusammenstellung zeigt:

Versuch	frische Hefe g	trockene Hefe g	g CO <sub>2</sub>		a b
			a Ohne Phosphat	b Mit 2,5% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
2 und 3	0,5	—	0,0594	0,0383	1,55
4	0,5	—	0,0523	0,0319	1,60
5	—	2,0	0,0165	0,0099	1,67

Es wurde nun zur Kontrolle untersucht, ob die Gärung unserer Hefe unter im übrigen gleichen Bedingungen wie früher in normaler Weise durch saures Phosphat beschleunigt wird.

## Versuch 6.

Minuten	ccm entwickelte CO <sub>2</sub>											g CO <sub>2</sub>
	10	20	30	40	50	60	70	80	100	120		
Ohne Phosphat	2,5	4,5	6,5	8,4	10,2	12,0	14,0	15,9	19,2	22,3		0,0392
Mit 2,5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5	5,2	8,0	10,0	13,5	16,2	19,6	21,9	26,7	32,7		0,0574

Im folgenden Versuchspaar wurde der phosphatlose Parallelversuch auf der H<sup>+</sup>-Ionenkonzentration  $p_H = 4,5$  gehalten.

## Versuch 7.

Minuten	ccm entwickelte CO <sub>2</sub>											g CO <sub>2</sub>
	10	20	30	40	50	60	70	80	100	120		
Ohne Phosphat $p_H = 4,5$	2,5	4,8	6,5	8,0	9,4	11,0	12,5	14,7	18,0	21,0		0,0369
Mit 2,5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5	5,0	7,5	9,8	12,5	14,5	16,8	19,2	24,0	29,0		0,0509

In beiden Versuchen zeigt sich also die bekannte aktivierende Wirkung des Phosphates in saurer Lösung.

Sogar bei der noch größeren H<sup>+</sup>-Ionenkonzentration  $p_H = 2,6$  ist die Phosphatwirkung stark positiv.

## Versuch 8.

$p_H$		Nach 150 Minuten entwickelte	
		ccm CO <sub>2</sub>	ccm CO <sub>2</sub>
2.	Ohne Phosphat	23,5	0,0413
2.	Mit 2,5% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	36,8	0,0646

Um uns zu überzeugen, daß die stark hemmende Wirkung des Phosphates in alkalischer Lösung nicht durch die Gegenwart eines Puffers überhaupt bedingt, sondern dem Phosphation eigentümlich ist, wurde im Versuch 9 bei Einhaltung der gleichen Alkalinität und der sonstigen Bedingungen die entsprechende Menge Alanin zugesetzt, dessen Pufferwirkung ganz analog ist der des öfter angewandten Glykokolls.

## Versuch 9.

Minuten	ccm zugesetzte 0,5 normale Natronlauge										g CO <sub>2</sub>
	10	20	30	40	50	60	80	100	120	150	
Ohne Phosphat	0,52	1,06	1,60	2,14	2,68	3,27	4,65	6,02	7,34	9,45	0,0869
Mit 2,5% Alanin	2,80	3,60	3,90	4,25	5,05	5,90	7,75	9,75	11,75	14,45	0,0317

Nachdem somit die beobachtete Wirkung als Effekt des Phosphates in alkalischer Lösung festgestellt war, wurde der Einfluß der Phosphatkonzentration bei gleichbleibender Alkalinität gemessen.

## Versuch 10.

Minuten	ccm zugesetzte 0,5 normale Natronlauge										g CO <sub>2</sub>
	10	20	30	40	50	60	80	100	120	150	
Ohne Phosphat	1,00	1,50	2,12	2,62	3,25	3,85	5,10	6,45	7,80	9,80	0,0580
Mit 0,5% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,90	2,41	2,72	3,15	3,67	4,10	5,02	6,11	7,30	9,12	0,0513

## Versuch 11.

Minuten	ccm zugesetzte 0,5 normale Natronlauge										g CO <sub>2</sub>
	10	20	30	40	50	60	80	100	120	150	
Ohne Phosphat	0,84	1,44	2,10	2,81	3,50	4,15	5,35	6,75	8,20	10,00	0,0553
Mit 1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,70	3,00	3,30	3,55	4,00	4,45	5,05	5,85	6,95	8,60	0,0430

## Versuch 12.

Minuten	ccm zugesetzte 0,5 normale Natronlauge										g CO <sub>2</sub>
	10	20	30	40	50	60	80	100	120	150	
Ohne Phosphat	0,85	1,60	2,20	2,91	3,65	4,20	5,45	6,70	8,25	10,00	0,0594
Mit 2,5% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,50	3,05	3,25	3,55	4,06	4,40	4,92	5,87	7,00	8,50	0,0383

## Versuch 13.

Minuten	ccm zugesetzte 0,5 normale Natronlauge										g CO <sub>2</sub>
	10	20	30	40	50	60	80	100	120	150	
Ohne Phosphat	0,88	1,36	2,00	2,52	3,20	3,88	5,04	6,28	7,96	10,00	0,0571
Mit 5% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,76	3,25	3,60	3,92	4,08	4,24	4,60	5,00	5,52	6,40	0,0288

Bäht man frische Hefe in Gegenwart von Alkaliphosphat und eines geeigneten antiseptischen Mittels, wie Toluol, Zucker vergären, so wird bekanntlich, wie eingangs erwähnt, in der Lösung das Alkalisalz einer Kohlenhydratphosphorsäure, ein Zymophosphat, angereichert. Ohne hier auf die für diese Reaktion optimale  $H^+$ -Konzentration einzugehen, sei nur erwähnt, daß bei einer Zusammensetzung der Lösung, wie bei obigen Versuchen und in Gegenwart von Toluol, das Zymophosphat nicht in der Lösung angereichert wird, wenn, wie oben, Phenolphthaleinalkalinität gehalten wird.<sup>1)</sup>

### Zusammenfassung.

Als Ergebnis kann folgende zusammenfassende Tabelle gegeben werden:

0,5 g Hefe in 50 ccm Glukoselösung. Temp. 20°.

PO <sub>4</sub> %	g CO <sub>2</sub> nach 150 Minuten		Relative Gärungs- geschwindigkeit
	Ohne Phosphat	Mit Phosphat	
0,5	0,0580	0,0513	0,88
1,0	0,0553	0,0430	0,78
2,5	0,0523	0,0319	0,61
5,0	0,0571	0,0288	0,50

Bei der Alkalinität, welche durch den Farbumschlag des Phenolphthaleins angegeben wird, verzögern Phosphate die alkoholische Gärung sowohl durch frische Hefe als durch Dauerhefe; die Verzögerung wächst mit der Phosphatmenge.

Bei obigen Verhältnissen erzeugt 2,5% PO<sub>4</sub>, bei  $H^+$ -Konzentration  $p_H = 8$ , Verzögerung von ca. 40%, während in saurer Lösung bei  $H^+$ -Konzentration  $p_H = 4,5$  eine Beschleunigung von ca. 40% eintritt. Dieser auffallende Befund wird weiter verfolgt werden.

<sup>1)</sup> Vermutlich ist die Permeabilität der äußeren Plasmaschicht für Phosphat von der Konzentration der  $H^+$ - bzw.  $OH^-$ -Ionen in der Lösung abhängig.