

Zur Kenntnis der Zymophosphatbildung bei der alkoholischen Gärung.

Von

Hans Euler, Olof Svanberg, Greta Hallberg und Karin Brandting.

Mit vier Figuren im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. Juli 1917.)

Vor einigen Wochen haben Euler und Svanberg Versuche mitgeteilt, welche die Frage behandeln, in welchem Stadium der Gärung die Veresterung des vergärbaren Kohlenhydrates mit Phosphorsäure eintritt.¹⁾ Die folgenden Versuche betreffen die gleiche Frage.

Unser Material war diesmal eine untergärige Bierhefe. In Verfolgung unserer Studien über alkalische Phosphatgärung²⁾ haben wir auch zu den vorliegenden Versuchen Parallelversuche mit Überschuß von Hydroxylionen angestellt. Während wir aber früher die Alkalinität nach der Indikatormethode von Sørensen gemessen haben — Untersuchungen auf diesem Gebiet ohne genaue Feststellung der Alkalinität können wohl nur von orientierender Bedeutung sein —, wurden diesmal die H⁻- bzw. OH⁻-Konzentrationen elektrometrisch, ebenfalls in engem Anschluß an Sørensens Arbeitsmethode ermittelt. Wenn es auf die Messung der zeitlichen Veränderung der Acidität bzw. Alkalinität ankommt, ist diese Methode vorzuziehen.

Die Versuche wurden durchweg mit Glukose ausgeführt, um kompliziertere Verhältnisse, welche bei der Verwendung von Disacchariden eintreten können, auszuschließen.

¹⁾ Euler und Svanberg, Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 148 (1917).

²⁾ Euler und Tholin, Diese Zeitschr., Bd. 97, S. 269 (1916).

Versuch 1 A und B.

50 g Glukose, 25 g Na_2HPO_4 , 75 g abgepreßte Hefe (30% Trockengehalt) in 250 ccm Wasser. Zusatz von 2,5 ccm Toluol.

A und B sind Parallelversuche, gleichzeitig bei 18° ausgeführt. In gleichmäßigen Zeitabschnitten wurden aus beiden Lösungen 5 ccm zur Phosphatanalyse abpipettiert.

A.

Entwickelt seinen natürlichen Säuregrad.

Std.	$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ g	Acidität P_H
0	0,130	7,8
1	0,130	6,5
2	—	6,3
3	0,131	6,3
4	0,132	—
5	0,132	—
6	0,131	—
7	0,131	—
25	0,088	—
46	0,056	—

Drehung im 10 cm-Rohr
vor der Gärung: $\alpha = 9,9^\circ$.

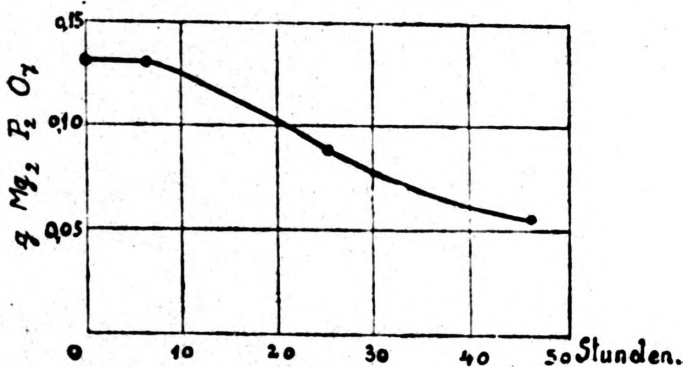
B.

Lösung wird schwach alkalisch gehalten.

Std.	$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ g	Acidität P_H
0	0,129	} 8,8 bis 9,2
1	0,132	
2	0,130	
3	0,130	
4	0,130	
5	0,126	
6	0,125	
7	0,125	

Drehung im 10 cm-Rohr
vor der Gärung: $\alpha = 9,9^\circ$
> > > : = $7,5^\circ$.

Versuch 1A



Figur 1.

Man beachte die geringe Reaktionsgeschwindigkeit, welche bei der Temperatur von 18° eintritt.

Versuch 1 C.

Die gleiche Lösung wie bei Versuch 1 A; ebenfalls Zusatz von 2,5 ccm Toluol.

Abweichend von 1 A ist hier die Versuchstemperatur 33°.

Drehung im 10 cm-Rohr
 vor der Gärung: $\alpha = 8,15^\circ$
 > > > : $\alpha = 4,25^\circ$.

Stunden	Mg ₂ P ₂ O ₇ g	p _H
0	0,130	7,0
0,5	0,130	6,6
1	0,128	6,6
1,5	0,126	6,6
2	0,112	6,6
2,5	0,014	—
3	0,000	—
3,5	—	6,5

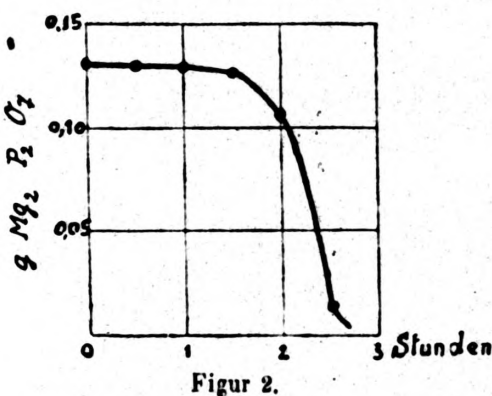
Die Ergebnisse sind in der Figur 2 graphisch dargestellt.

Hier tritt die Erscheinung zutage, auf welche wir in dieser Mitteilung die Aufmerksamkeit lenken wollen: Das anorganische Phosphat ist in der ersten Hälfte der Reaktionszeit

so gut wie unverbraucht, worauf die Phosphatbindung scharf und mit großer Geschwindigkeit einsetzt. Die Acidität war, wie die p_H-Werte zeigen, während der Reaktion so gut wie konstant.

Der Kontrolle dieser, wie wir glauben, für das Verständnis der Gärungsreaktion wesentlichen Erscheinung gelten die folgenden Versuche.

Versuch 1 C.



Versuch 2 (10. Mai 1917).

Die gleichen Lösungen wie beim Versuch 1 A und 1 B.
Temperatur 33°.

Zwei Parallelversuche: A mit 2,5 ccm Toluol, B ohne Toluol. A entwickelt seine natürliche Acidität, B wird durch kontinuierliche Zusätze auf der Alkalinität $p_H = 8,5$ gehalten.

Im 10 cm-Rohr beträgt die Drehung der Lösungen vor der Gärung 9,33°.

A.
2,5 ccm Toluol.

Stunden	Mg ₂ P ₂ O ₇ in 5 ccm g
0	0,134
0,5	0,134
1	0,134
1,5	0,132
1,75	0,129
2	0,128
2,25	0,081
2,50	0,035
2,75	0,014
3	0,008
3,25	0,005

B.
ohne Toluol; alkalisch.

Stunden	Mg ₂ P ₂ O ₇ in 5 ccm g
0	0,132
1	0,131
2	0,131
3	0,130
4	0,130
5	0,131
6	0,134
7	0,133

Drehung mit 3,25 Stunden: 3,60°.

Drehung nach 7 Stunden: 3,94°.

Versuch 2 A



Figur 3.

Der Versuch 2 A wird durch die Figur 3 graphisch dargestellt.

Versuch 3 (12. Mai 1917).

Die gleichen Versuchsbedingungen wie bei Versuch 2.

Drehung im 5 cm-Rohr vor der Gärung: 5,1°.

A.

2,5 ccm Toluol.

Stunden	Mg ₂ P ₂ O ₇ in 5 ccm g
0	0,131
0,25	0,131
0,75	0,131
1,00	0,131
1,25	—
1,50	0,130
1,75	0,127
2,00	0,094
2,25	0,056
3,00	0,014
3,25	0,013

Drehung nach 3,25 Stunden: 1,65°.

Versuch 3 A ist in Fig. 4, Kurve A, wiedergegeben.

Der Reaktionsverlauf, wie er durch die Kurven Fig. 2, 3 und 4 A dargestellt wird, kann kaum anders gedeutet werden, als daß aus der Glukose in der ersten Hälfte der Reaktionszeit ein Umwandlungsprodukt gebildet wird, nach dessen Bildung die Veresterung erst eintreten kann.

Dieses Ergebnis hat uns an eine ältere, von Euler und Ohlsén¹⁾ gefundene Tatsache erinnert, daß eine durch Extraktion von Hefe erhaltene Phosphatlösung Glukose mit Phosphat erst dann zu verestern vermag, wenn die Glukoselösung mit lebender Hefe kurze Zeit vorbehandelt worden ist.

Wir haben deshalb 250 ccm unserer Glukoselösung ¹/₂ Stunde lang mit 10 g lebender Hefe vorbehandelt.

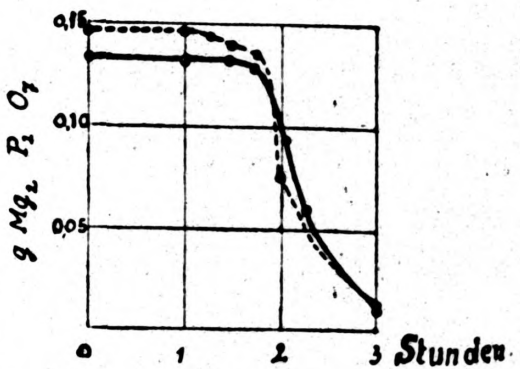
B.

Ohne Toluol; p_H = 8,5.

Stunden	Mg ₂ P ₂ O ₇ in 5 ccm g
0	0,144
0,5	0,144
1	0,146
1,5	0,145
2	0,143
3	0,143
3,5	0,143

Drehung nach 3,5 Stunden: 2,52°.

Versuch A₃ und C₃



Figur 4.

¹⁾ Euler und Ohlsén, Biochem. Zeitschr., Bd. 37, S. 313 (1911).

Die Drehung der so vorbehandelten Lösung betrug im 5 cm-Rohr $4,65^\circ$. Hierauf wurde ebenso verfahren, wie im vorhergehenden Versuch.

C. 2,5 ccm Toluol.		D. Ohne Toluol; $p_H = 8,5$.	
Stunden	$Mg_2P_2O_7$ in 5 ccm g	Stunden	$Mg_2P_2O_7$ in 5 ccm g
0	0,146	0	0,143
1	0,146	0,5	0,140
1,25	0,140	1	0,141
1,50	0,135	2	0,139
1,75	0,132	3	0,140
2,00	0,075	3,5	0,140
2,25	0,056		
3,00	0,015		
3,25	0,014		

Drehung nach 3,25 Stunden: $1,75^\circ$.

Drehung nach 3,5 Stunden: $1,93^\circ$.

Versuch C ist in Figur 4 durch Kurve C₁ dargestellt.

Durch die Vorbehandlung ist also der Verlauf der Reaktion nicht wesentlich geändert worden. Leider waren wir gezwungen, unsere Versuche hier abzubrechen.

Zur Erklärung der Form der Reaktionskurven dürfte die oben gemachte Annahme, daß zunächst ein Umwandlungsprodukt der Glukose entsteht, welche weiterhin verestert wird, nicht vollständig ausreichen. Vielmehr wird der Schluß nahegelegt, daß während der ersten Hälfte der Reaktion ein Katalysator gebildet oder vermehrt bzw. in seiner Wirksamkeit gesteigert wird, welcher die schnell einsetzende Phosphatbindung beschleunigt. Man wird dabei an das synthetisierende Enzym der Hefe, die Phosphatase, denken. Es sollen deshalb diese Versuche zunächst in der Weise fortgesetzt werden, daß die Vorbehandlung der Glukoselösung durch Hefe in Abwesenheit von Phosphat, aber in Gegenwart von Toluol erfolgt.