

# Über die Rolle der Phosphate bei der alkoholischen Gärung.

Von

Hans Euler und S. Heintze.

---

(Aus dem chemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Mai 1918.)

---

Nachdem v. Baeyer 1870 zum erstenmal den Zerfall der Hexosen in Alkohol und Kohlensäure näher formuliert hatte, wurden von mehreren Forschern Schemen aufgestellt, welche ihre Anschauungen über den Zuckerzerfall im einzelnen wiedergeben. Das bekannteste dieser Schemen ist dasjenige von Wohl, nach welchem Glycerinaldehyd, Milchsäure und Methylglyoxal sowie ein Umwandlungsprodukt des Methylglyoxals als Zwischenprodukte gebildet werden. Für das Auftreten dieser Stoffe sind mannigfache experimentelle Stützen erbracht worden, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann.<sup>1)</sup>

Einen wesentlichen Fortschritt hinsichtlich der Kenntnis der Teilreaktion bei der alkoholischen Gärung verdankt man bekanntlich Iwanoff sowie Harden und Young.

Nachdem Harden und Young durch sorgfältige Versuche gezeigt hatten, daß durch Zusatz von Phosphat zu Preßsaft die Geschwindigkeit der Gärung außerordentlich gesteigert wird, konnten sie auch quantitativ feststellen, daß die Steigerung der Entwicklung von Kohlensäure und Alkohol dem zugesetzten Phosphat proportional ist.<sup>2)</sup>

Die genannten Forscher erkannten sofort die fundamentale Bedeutung dieser Beobachtung. In einer weiteren Unter-

---

<sup>1)</sup> In neuester Zeit ist das Wohlsche Schema von Neuberg (vgl. Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz in der Zelle, Monogr. Jena, 1913, G. Fischer) wesentlich modifiziert worden, welcher der Brenztraubensäure die Rolle eines Zwischenproduktes bei der alkoholischen Gärung zuschreibt.

<sup>2)</sup> Harden und Young, Proc. Roy. Soc. B., Bd. 77, S. 405 (1906).

suchung konnte dann gezeigt werden, daß die Steigerung der Gärwirkung wiederholt werden kann, und zwar wird, wie die Figur zeigt, die Gärungsgeschwindigkeit gesteigert, bis das Phosphat verbraucht ist. Die Versuche von Euler und Johansson zeigten zunächst, daß das gleiche beim Extrakt von Trockenhefe eintritt.<sup>1)</sup>

Harden und Young schlossen nun aus ihren Versuchen weiter,<sup>2)</sup> daß zwischen dem Zucker und dem Phosphat eine chemische Reaktion eintritt, und konnten diesen Schluß auch bald bestätigen. Unterbricht man nämlich bei ihrem obenerwähnten Versuch die Gärung, sobald die Geschwindigkeit ihren normalen Betrag wieder erreicht hat, so findet man, daß nur ein kleiner Teil des gesamten in der Lösung befindlichen Phosphates in freier Form existiert, während der größere Teil des Phosphats nicht mehr durch Magnesiamischung fällbar und also in eine neue Verbindung übergeführt ist.

Etwa zu gleicher Zeit machte L. Iwanoff<sup>3)</sup> die wichtige Beobachtung, daß Hefe freie Phosphate in organische Verbindungen überführt, und daß diese Wirkung sich nicht auf Hefe beschränkt, sondern auch höheren Pflanzen eigen ist.

Nachdem Iwanoff<sup>4)</sup> gezeigt hatte, daß bei der Anwendung von Trockenhefe zugesetzte Phosphate ihre Fällbarkeit durch Uranacetat verlieren und organisch gebunden werden, wurde die Zusammensetzung der entstandenen organischen Verbindung endgültig von Harden und Young aufgeklärt. Sie entspricht bekanntlich der Formel  $C_6H_{10}O_4(PO_4)_2R_2$  und zwar dürfte dieses Produkt im wesentlichen, wie schon Harden und Young betonten, als Diphosphorsäureester der Fruktose anzusehen sein.

Daß dieser Kohlenhydratphosphorsäureester — er mag der Kürze halber vorbehaltlich der Zustimmung der Entdecker Harden und Young als Zymophosphat bezeichnet werden — bei der alkoholischen Gärung durch Hefepreßsaft, Hefenextrakt oder Trockenhefe eine zentrale Rolle spielt, ist eine durch die

<sup>1)</sup> Euler und Johansson, Bd. 85, S. 192 (1913).

<sup>2)</sup> Harden und Young, Proc. Chem. Soc. B., Bd. 21, S. 189 (1905).

<sup>3)</sup> Iwanoff, Trav. de la Soc. Nat. de St. Petersburg, Bd. 34 (1905).

<sup>4)</sup> Iwanoff, Diese Zeitschr., Bd. 50, S. 281 (1907).

obengenannten Versuche einwandfrei experimentell festgestellte Tatsache.

Das Zymophosphat tritt aber in der Hefe nicht allein als Zwischenprodukt auf, sondern es hat sich auch gezeigt, daß es eine erhebliche Beschleunigung der Gärung durch lebende Hefe hervorruft,<sup>1)</sup> eine Beobachtung, welche Harden und Young<sup>2)</sup> an englischen Oberhefen bestätigen konnten.

Im Anschluß hieran ist schließlich noch zu erinnern, daß auch nach unseren Versuchen die Enzyme des Phosphatumsatzes, Phosphatase und Phosphatase, keineswegs auf die Hefe beschränkt sind, sondern auch in anderen Mikroorganismen, für welche Zuckergärung eine wesentliche Energiequelle bildet, nachgewiesen werden kann.

Als im hiesigen Laboratorium 1911 begonnen wurde, die Einwirkung von tierischen Enzymen bzw. Organextrakten auf Kohlenhydratphosphorsäureester zu studieren, war über das Verhalten der Zymophosphate im Tierkörper überhaupt nichts bekannt. Im Anschluß an die Versuche über tierische Phosphatasen untersuchten Euler und Funke,<sup>3)</sup> ob durch Organextrakte Vergärung bzw. Glykolyse hervorgerufen würde.

Diese Versuche wurden zunächst einerseits mit feiner-schnittenen Muskeln, andererseits mit der pulverisierten Leber eines frischgeschlachteten Kaninchens angestellt. Zu je 1 g dieser Substanzen wurden außer Toluol als Antiseptikum 21 ccm 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub>ige Glykoselösung zugefügt, in Parallelversuchen außerdem 0,5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bzw. 0,5 g Zymase-Coenzympräparat. Diese Versuche verliefen insofern negativ, als innerhalb 24 Stunden keine Kohlensäureentwicklung beobachtet wurde. Das Verschwinden der Glykose wurde zwar damals messend verfolgt, indessen wurden darüber keine Angaben veröffentlicht, da über die Spaltprodukte keine Klarheit gewonnen war.

Nachdem Rona und Döblin<sup>4)</sup> bereits auf die Bedeutung der Phosphate bei der Glykose aufmerksam gemacht haben,

<sup>1)</sup> Euler und Bäckström, Diese Zeitschr., Bd. 77, S. 394 (1912).

<sup>2)</sup> Harden, Alcoholic Fermentation, Second Edition, 1914.

<sup>3)</sup> Euler und Funke, Diese Zeitschr., Bd. 77, S. 488 (1912).

<sup>4)</sup> Rona und Döblin, Biochem. Zeitschr., Bd. 32, S. 504 (1911).

ist Embden<sup>1)</sup> mit seinen Mitarbeitern in einer Reihe sehr bemerkenswerter Untersuchungen zu Resultaten gekommen, welche deutlich dartun, daß die Kohlenhydratphosphorsäure eine wesentliche Rolle beim Stoffwechsel in den Muskeln spielt.

Er konnte zeigen, daß Muskeln und Muskelpreßsaft in kurzer Zeit Milchsäure und Phosphorsäure liefern, und zwar in zahlreichen Fällen äquivalente Mengen der beiden Säuren. Der Umfang der im Muskel beobachteten Phosphorsäurebildung kann durch keine andere Substanz gesteigert werden, als durch das Zymophosphat der Hefe.

Als Muttersubstanz der beiden genannten Säuren nahmen Embden und seine Mitarbeiter zunächst das Lactacidogen an, dessen Vorkommen sie in verschiedenen Muskeln nachweisen konnten. Sie sprachen bald die Vermutung aus, daß das Lactacidogen mit dem Zymophosphat strukturell ähnlich sei. Schließlich gelang es Embden und Laquer<sup>2)</sup> nachzuweisen, daß Laktacidogen und Zymophosphorsäure identisch seien.

«Es scheint — schreibt Laquer<sup>3)</sup> —, als ob die intermediäre Bindung des Kohlenhydrats an Phosphorsäure in ähnlicher Weise die notwendige Voraussetzung für das Zustandekommen der Milchsäurebildung aus Kohlenhydrat ist, wie die intermediäre Hexosephosphorsäurebildung bei der alkoholischen Gärung der Hefe allem Anschein nach als ein für das Zustandekommen der letzteren notwendiger Vorgang betrachtet werden muß.»

Wie in der Hefe die Phosphatase und die neben derselben vorhandene Phosphatase in steter Wechselwirkung eine der ersten Phasen des Kohlenhydratumsatzes vermitteln, so dürfte auch im Muskel durch eine Phosphatase eine enzymatische Phosphorsäureveresterung eintreten.

Das Ausbleiben der Phosphorsäurebildung bei der einfachen Tätigkeit isolierter Froschmuskeln, die bekanntlich mit

---

<sup>1)</sup> Embden, Griesbach und Schmitz, Diese Zeitschr., Bd. 93, S. 1 (1914); Embden und Laquer, ebenda, S. 94; Embden, Griesbach und Laquer, ebenda, S. 124.

<sup>2)</sup> Embden und Laquer, Diese Zeitschr., Bd. 98, S. 181 (1911).

<sup>3)</sup> Laquer, ebenda, Bd. 93, S. 61 (1914).

einer ganz wesentlichen Milchsäurebildung verknüpft ist, erklärt sich nämlich vielleicht so, daß unter diesen physiologischen oder nahezu physiologischen Bedingungen die assimilatorische Anlagerung von Kohlenhydrat an Phosphorsäure der dissimilatorischen Spaltung von Lactacidogen zu Milchsäure und Phosphorsäure die Wage hält.<sup>1)</sup>

Die Versuche von Embden sprechen dafür, daß der Kohlenhydratabbau im Muskel ebenso wie derjenige der Hefe beginnt mit einer synthetischen Anlagerung des Kohlenhydrats der Phosphorsäure oder doch an einem phosphorsäurehaltigem organischen Komplex.<sup>2)</sup>

Embden hielt es für möglich, daß der Muskel nicht nur die Synthese von Kohlenhydrat mit Phosphorsäure bewirken kann, sondern daß er auch, ganz ähnlich wie die Leber, imstande ist, Milchsäure in Kohlenhydrat zurückzuverwandeln.<sup>3)</sup>

Diese Beteiligung des Zymophosphates am Kohlenhydratstoffwechsel im Muskel dürfte nicht die einzige Rolle sein, welche dieser Körper im tierischen Organismus spielt.

Da die Spaltung des Zymophosphates im Muskel in Milchsäure und Phosphorsäure in saurer Lösung vor sich zu gehen scheint, entsteht die Frage, inwieweit die an diesem Umsatz beteiligten Enzyme der Phosphatase und Phosphatase der Hefe entsprechen. Es hat den Anschein, daß im Muskel ein kräftiger wirkendes milchsäurebildendes Enzym mit den Enzymen des Phosphorumsatzes zusammenwirkt, als in der Hefe.

Andererseits legen die bis jetzt bekannt gewordenen Tatsachen über die Phosphatwirkung im Blut die Vermutung nahe, daß das Zymophosphat auch im Blut auftritt und eine Umsetzung erfährt, und wir würden es in diesem Fall hier mit einer alkalischen Gärung zu tun haben, deren Zwischenprodukte eine Oxydation erfahren. Von diesem Gesichtspunkt aus sind im hiesigen Laboratorium Oxydationsgärungen unternommen worden.

<sup>1)</sup> Embden und Laquer, Diese Zeitschr., Bd. 93, 96 (1914).

<sup>2)</sup> Embden, Griesbach und Schmitz, Diese Zeitschr., Bd. 93, S. 44 (1914).

<sup>3)</sup> Embden, Griesbach und Laquer, Diese Zeitschr., Bd. 93, S. 142 (1914).

Durch die Versuche von Embden und seiner Mitarbeiter steht also experimentell fest, daß Zymophosphat eine wesentliche Rolle beim Zuckerabbau im Muskel spielt. Es ist damit wenigstens für eine Phase des Zuckerabbaues im Tierkörper eine wesentliche Analogie mit dem Zuckerabbau bei der Gärung — zunächst bei der Zymasegärung — experimentell festgestellt und damit ein wichtiger chemischer Stützpunkt geliefert für die Annahme, daß Atmung und Gärung, welche in Pflanzen sich bis zu einem gewissen Grad vertreten können, ganz allgemein in naher chemischer Beziehung zueinander stehen.

Auf die nähere Diskussion dieser Beziehungen wollen wir hier nicht eingehen, da wir an anderer Stelle bald ausführlicher auf dieselben zurückzukommen hoffen.

Es sei hier nur auf eine auffallende, in letzter Zeit von Neuberg<sup>1)</sup> geäußerte Ansicht hingewiesen. Neuberg geht davon aus, daß die Esterbildung zwischen Phosphorsäure und Hexosen durch eine Reihe lebender Hefen auch in Gegenwart von Toluol nicht oder nur wenig eintritt, während die gleichen Hefen in getrocknetem Zustand fast vollständig verestern. Hierzu schreibt Neuberg: «Diese Erscheinung könnte wohl dafür sprechen, daß die unter besonderen Umständen erfolgende Vereinigung von Phosphat in Zucker ein pathologisches Geschehnis, vielleicht der Ausdruck eines Vergiftungsvorganges bei abnormen  $P_2O_5$ -Konzentrationen ist, aber selbst im Falle der physiologischen Natur dieser Reaktion würde sie an sich nicht das geringste besagen für die Frage der alkoholischen Zuckerspaltung».

Wie sich diese Auffassung Neubergs mit den zahlreichen festgestellten quantitativen Beziehungen zwischen Gärkraft und Phosphatgehalt in gärenden Zuckerlösungen vereinbaren läßt, welche Harden und Young für Hefesäfte, Euler und Johansson für Trockenhefe und lebende Hefe gefunden haben, ist uns einstweilen nicht verständlich. Immerhin ist die Annahme Neubergs, daß die Bildung des Zymophosphates nicht ein physiologisches, sondern ein pathologisches Geschehnis

<sup>1)</sup> Neuberg, Levite, Färber und Schwenk, Biochem. Zeitschr., Bd. 83, S. 244 (1917).

sei, vom biochemischen und biologischen Standpunkt aus bemerkenswert.

Zu einzelnen tatsächlichen Angaben von Neuberg hat sich der eine von uns (E.) bereits geäußert.<sup>1)</sup>

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß lebende Oberhefe sich hinsichtlich der Bildung des Zymophosphats, soweit die gegenwärtigen Erfahrungen reichen, in der Regel anders verhält, als die meisten Unterhefen. Bei den Unterhefen hatten ja Euler und Johansson<sup>2)</sup> zuerst festgestellt, daß dieselben in frischem Zustande bei Gegenwart von Toluol quantitativ verestern, und nach diesem Verfahren wird seit längerer Zeit Zymophosphat fabrikmäßig dargestellt.

In Abwesenheit eines Protoplasmagiftes tritt die Veresterung durch lebende Hefe nicht oder nur in außerordentlich geringem Grade ein.<sup>3)</sup>

Im Anschluß an die früheren Versuche von Euler und Johansson (l. c.) und die neueren von Euler, Svanberg, Hallberg und Brandting<sup>4)</sup> und noch unveröffentlichte Versuche von Euler wurden einige neue Versuchsreihen angestellt mit einer in frischem Zustand mit Protoplasmagift nicht veresternden Oberhefe.

### Neue Versuche.

Als Protoplasmagift kam hier Phenol zur Anwendung. Als Hefe verwendeten wir eine besonders reine Brennerei-

<sup>1)</sup> Euler, Biochem. Zeitschr., Bd. 86, S. 337 (1918).

<sup>2)</sup> Euler und Johansson, Diese Zeitschr., Bd. 80, S. 175 (1912).

<sup>3)</sup> Damit sei folgender Satz in der erwähnten Arbeit von Neuberg, Levite, Färber und Schwenk, S. 252 richtig gestellt: «Doch haben L. Iwanoff (1905), sowie A. v. Lebedew (1910) bereits hervorgehoben, daß auch frische Hefe dazu (Gewinnung des Hexosebiphosphats) geeignet ist, und die gleiche Angabe hat in neuerer Zeit auch Euler gemacht.»

Tatsächlich haben Euler und Johansson gerade im Gegenteil gezeigt, daß frische Hefe in einigermaßen nennenswertem Grad nur dann verestert, wenn Protoplasmagifte wie Toluol zugesetzt werden.

<sup>4)</sup> Euler, Svanberg, Hallberg und Brandting, Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 203 (1917).

hefe, welche von der Södra Stockholms Preßhefefabrik geliefert wurde; wir bezeichnen dieselbe mit SB. II.

Bei allen Versuchen kam folgende Lösung zur Anwendung:

100 ccm 10%ige Natriumphosphatlösung,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
 + 75 „ 25%ige Invertzuckerlösung.

Dazu wurden bei Parallelversuchen

einerseits 25 ccm Wasser

andererseits 25 ccm 2%ige Phenollösung

zugesezt. Gesamtvolumen war somit 200 ccm. Acidität  $p_{\text{H}} = 5,5$ .

In von Zeit zu Zeit entnommenen Proben wurde die freie Phosphorsäure in bekannter Weise durch Magnesiummischung gefällt, und diese Fällung als  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  zur Wägung gebracht.

Versuch 1 a.

25 g frische Hefe mit und ohne Phenol.

Stunden	Gramm $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ in 2 ccm	
	ohne Phenol	mit Phenol
0	0,0300	0,0305
6	0,0296	0,0293

Versuch 1 b.

6 Stunden getrocknete Hefe.

Stunden	Gramm $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ in 2 ccm			
	20 g Hefe		10 g Hefe	
	mit Phenol	ohne Phenol	mit Phenol	ohne Phenol
1	0,0316	0,0305	0,0318	0,0318
6	0,0310	0,0304	0,0308	0,0315

Versuch 1 c.

12 Stunden getrocknete Hefe.

Stunden	Gramm $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ in 2 ccm			
	20 g Hefe		10 g Hefe	
	mit Phenol	ohne Phenol	mit Phenol	ohne Phenol
1	0,0296	0,0308	0,0301	0,0340
6	0,0293	0,0307	0,0300	0,0330



Versuch 1 d.  
24 Stunden getrocknete Hefe.

Stunden	Gramm $Mg_2P_2O_7$ in 2 ccm			
	20 g Hefe		10 g Hefe	
	mit Phenol	ohne Phenol	mit Phenol	ohne Phenol
1	0,0255	0,0240	0,0296	0,0210
5	0,0094	—	—	—
6	0,0073	0,0156	0,0257	0,0208

Versuch 2 a.

8 Stunden getrocknete Hefe. Wassergehalt der Hefe 43,9%.

Stunden	Gramm $Mg_2P_2O_7$ in 2 ccm			
	20 g Hefe		10 g Hefe	
	mit Phenol	ohne Phenol	mit Phenol	ohne Phenol
1	0,0239	0,0225	0,0237	0,0260
5	0,0232	0,0222	0,0230	0,0262
6	0,0228	0,0223	0,0227	0,0259

Versuch 2 b.

15 Stunden getrocknete Hefe. Wassergehalt der Hefe 36,4%.

Stunden	Gramm $Mg_2P_2O_7$ in 2 ccm			
	20 g Hefe		10 g Hefe	
	mit Phenol	ohne Phenol	mit Phenol	ohne Phenol
1	0,0228	0,0238	0,0264	0,0239
2	0,0225	0,0231	0,0246	0,0234

Versuch 2 c.

21 Stunden getrocknete Hefe. Wassergehalt der Hefe 20%.

Stunden	Gramm $Mg_2P_2O_7$ in 2 ccm			
	20 g Hefe		10 g Hefe	
	mit Phenol	ohne Phenol	mit Phenol	ohne Phenol
1	0,0270	0,0296	0,0291	0,0294
6	0,0268	0,0248	0,0282	0,0283

## Versuch 2 d.

25 Stunden getrocknete Hefe. Wassergehalt der Hefe 8%.

Stunden	Gramm $Mg_2P_2O_7$ in 2 ccm			
	20 g Hefe		10 g Hefe	
	mit Phenol	ohne Phenol	mit Phenol	ohne Phenol
1	0,0302	0,0275	0,0296	0,0287
5	0,0103	0,0201	0,0287	0,0280
6	0,0096	0,0202	0,0288	0,0279

Die hier ausführlich mitgeteilten Ergebnisse sind noch in weiteren Versuchsreihen bestätigt worden, von deren Wiedergabe hier im Interesse der Raumersparnis abgesehen wird.

## Zusammenfassung.

1. Aus dem angegebenen Zahlenmaterial, das sich auf eine Brennerei-Oberhefe, S. B. II bezieht, geht hervor:

a) Die hier zum erstenmal quantitativ untersuchte Beziehung zwischen Wassergehalt der Hefe zeigt als Hauptmerkmal den starken Einsatz des Veresterungsvermögens der Hefe bei Wassergehalten von 15—10%.

b) Die Veresterung ist der Hefemenge nicht proportional, sondern steigt in gewissen Grenzen sehr viel schneller mit der Hefemenge an.

c) Bei Hefenstämmen, welche in frischem Zustand durch Toluol und andere Protoplasmagifte nicht zur Veresterung angeregt werden, üben Protoplasmagifte wie Toluol und Phenol nach einer gewissen Vortrocknung der Hefe einen wesentlichen Einfluß auf die Bildung von Zymophosphat aus.

2. Einleitungsweise werden solche Tatsachen zusammengestellt, welche für die wesentliche Rolle des Phosphats bei normaler alkoholischer Gärung und für die allgemeinen nahen Beziehungen zwischen der Phosphatwirkung beim Zuckerabbau im tierischen und höheren pflanzlichen Organismus und bei der alkoholischen Hefegärung sprechen; diese Tatsachen werden der von Neuberg (Biochem. Zeitschr., Bd. 83, S. 244) geäußerten Ansicht gegenübergestellt, daß «die unter besonderen Umständen erfolgende Vereinigung von Phosphat und Zucker ein pathologisches Geschehnis . . . ist».