

TRIOSEPHOSPHORSÄURE ALS INTERMEDIÄRPRODUKT BEI DER ZUCKERGÄRUNG MIT INTAKTER HEFE

von

WILHELM KISSLING

*Biochemisches Laboratorium der wissenschaftlichen Abteilung von C. H. Boehringer Sohn,
Ingelheim/Rhein (Deutschland)*

Der heute allgemein anerkannte Abbauweg bei der Vergärung von Zucker zu Alkohol über phosphorylierte Intermediärprodukte wurde für den zellfreien Fermentextrakt (Macerationssaft) als Schema im Jahre 1933 von O. MEYERHOF¹ im Prinzip das erstmal aufgestellt und im Jahre 1935² und 1937³ ergänzend erweitert. Bei diesem Schema wird zwischen Initialphase und stationärer Phase unterschieden. In der Ergänzung von 1937 findet sich auch eine Erklärung für die Entstehung der HARDEN-YOUNG'schen Gärungsphase im zellfreien Macerationssaft; aber gerade die Bildung von Hexoseestern ist für die Gegner dieses Schemas immer ein Punkt der Kritik, nach der der Abbau des Zuckers in der lebenden Zelle anders verlaufen sollte, weil bei ihr diese Ester als Gärungszwischenprodukte nicht nennenswert sich anhäufen und nachzuweisen sind. In einem wirklichen stationären Zustand ist nun die Anreicherung eines Intermediärproduktes nicht zu erwarten, da jeder Fall dieser Art eine Zustandsänderung voraussetzt, sei es Alterung, Hemmung durch Gifte oder Erschöpfung von Nährstoffen u.s.w. Auch die Initialphase der Gärung ist eine solche Zustandsänderung. Im folgenden soll die vorübergehende Anreicherung einer Triosephosphorsäure als Intermediärprodukt bei der Angärung von intakter Hefe beschrieben werden.

METHODIK

Triosephosphorsäure wurde nachgewiesen als Milchsäure, welche durch alkalische Verseifung bei Zimmertemperatur nach der von O. MEYERHOF UND K. LOHMANN^{3a} beschriebenen Reaktion entsteht: Triosephosphat → Milchsäure + Phosphat. Die so gebildete Milchsäure in den Gäransätzen wurde folgendermassen bestimmt: 20 ml Gärösung wurden filtriert, schwach Phenolphthalein-alkalisch zur Trockne verdampft, 2 mal mit Wasser aufgenommen und nochmals verdampft, im Schwefelsäure-exsiccator über Nacht getrocknet; dann in 20 ml Wasser gelöst, und zur Verseifung der Triosephosphorsäure mit 1 ml 25% Natronlauge versetzt. Nach 10 Minuten Stehen bei Zimmertemperatur wurde mit 1 ml 25% Salzsäure neutralisiert, mit $\text{CuSO}_4 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$ gefällt, ein aliquoter Teil abgenommen und in der üblichen Weise nach FRIEDEMANN, CONTONIO UND SHAFFER⁴ die Milchsäure bestimmt. Als Hefe wurde Weinhefe Steinberg aus Geisenheim am Rhein oder Weinhefe Oppenheimer Kreuz aus Oppenheim am Rhein verwandt.

Natürliche Nährsubstrate waren Traubenmoste oder Moste aus anderen Früchten. Als synthetische Nährösung diente ein modifizierter Gäransatz nach HENNEBERG⁵, bestehend aus 15% Rohrzucker, 0,2% Pepton, 0,5% KH_2PO_4 , 0,2% MgSO_4 , pH 4,8.

Um die Triosephosphorsäure zu isolieren und fernerhin die bereits vorgebildete Milchsäure von derjenigen zu unterscheiden, die erst durch alkalische Verseifung entsteht, wurden die Gäransätze durch Fällung mit Bariumacetat und Alkohol fraktioniert. Beim Fraktionieren wurden 20-50 ml der mit Trichloressigsäure enteiweißten Gäransätze mit Bariumacetat versetzt und bei schwach lackmussaurer Reaktion mit 3 Teilen Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde mit Alkohol-Aether ge-

Literatur S. 198.

waschen und im Schwefelsäureexsiccator über Nacht getrocknet. Darauf wurde im ursprünglichen Volumen Wasser mit einigen Tropfen 2 n Salzsäure gelöst, Ba mit Na_2SO_4 ausgefällt, mit 1 ml 25%iger Natronlauge bei Zimmertemperatur verseift; dann mit 1 ml 25%iger Salzsäure neutralisiert und nach $\text{CuSO}_4\text{-Ca}(\text{OH})_2$ -Behandlung in einem aliquoten Teil die Milchsäure bestimmt. Ein entsprechender Anteil wurde vor der $\text{CuSO}_4\text{-Ca}(\text{OH})_2$ -Behandlung zur P_2O_5 -Bestimmung der Triosephosphorsäure abgenommen und als anorganisches Phosphat nach der Verseifung mit normaler Natronlauge bestimmt. Die kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung nach LOHMANNS UND JENDRASSIK⁶ wurde in einem lichtelektrischen Kolorimeter nach HAVEMANN mittels einer Eichkurve vorgenommen. Zunahme des anorganischen Phosphats nach alkalischer Verseifung entspricht der Triosephosphorsäure.

In der Mutterlauge der Bariumfällung konnte die wirkliche Milchsäure, d.h. diejenige, die nicht erst durch alkalische Verseifung entstanden ist, nach Ba-Fällung mit Natriumsulfat in der oben angegebenen Weise ebenfalls bestimmt werden.

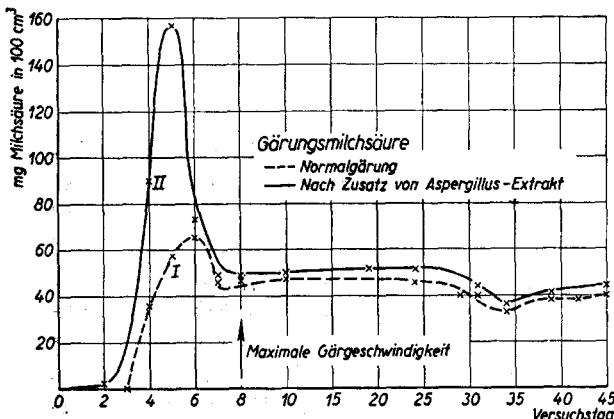


Abb. 1

VERSUCHE

Verfolgt man die Milchsäurebildung eines gärenden Traubensaftes während des ganzen Gärverlaufes, so ist zunächst in der Angärungsphase ein Ansteigen der Milchsäure festzustellen, die bei Beginn der stationären Phase auf einen gleichbleibenden Gehalt bis zum Ende der Gärung abfällt. In der Abb. 1 ist eine derartige Milchsäurebildung bei der normalen Vergärung von 1200 l Traubenmost aus Sylvanertrauben in der Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau zu Geisenheim aus dem Jahre 1944 aufgezeichnet. Das pH dieses Mostes betrug 3.3 und die Kellertemperatur Ende Oktober 9-11°. Kurve I (Abb. 1) zeigt in der Angärungsphase zwischen dem 2. und 8. Tag einen Anstieg der Milchsäure bis zu 65 mg/%, der dann bei einsetzender maximaler Gärgeschwindigkeit auf 46 mg/% absinkt und während und nach beendeter Gärung bei ungefähr 40 mg bleibt bis zum Einsetzen der bakteriellen Säuregärung. Es wurde nun weiter gefunden, dass sich dieser Milchsäureanstieg durch Zusatz eines wässrigen Extraktes aus getrockneten Schimmelpilzen (*Aspergillus niger*) bedeutend steigern lässt. Nach v. EULER UND NIELSEN⁷ enthält *Aspergillus niger* einen wasserlöslichen Wuchsstoff für Hefe, der wahrscheinlich zur Biosgruppe gehört. Bei Zusatz von

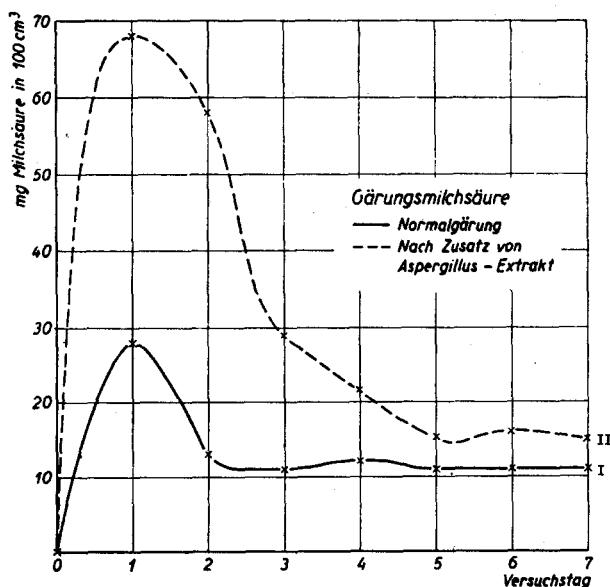


Abb. 2

2% eines derartigen 10%igen, wässrigen Extraktes stieg die Milchsäure nach 5 Tagen bis auf 159 mg in 100 ml Gärösung an (Kurve II).

Da das p_H eines Traubenmostes zwischen 3 und 3.5 relativ ungünstig für die Hefe liegt, erstreckt sich diese Angärungsphase bei einer verhältnismässig niedrigen Temperatur zwischen 9 und 12° auf etwa 6 Tage; bei Zimmertemperatur und bei einem für die Hefe günstigen p_H von 4.8 beschränkt sich diese Phase auf 2 Tage, wie in Laboratoriumsversuchen, z.B. mit einem Moste von Hagebuttenfrüchten, der mit Zucker auf etwa 20% versetzt war, zeigt (Abb. 2). Auch hier ist der Milchsäureanstieg (Kurve I) deutlich zu erkennen und beträgt bei Zusatz von Aspergillusextrakt mehr als das Doppelte (Kurve II).

Auch mit künstlicher Nährösung, wie sie oben beschrieben wurde, bei einem p_H von 4.8, ist dieser Anstieg und seine wesentliche Steigerung durch einen Aspergillus-Extrakt als Gärungsaktivator klar ersichtlich, wie die Tabelle I zeigt. Die Angärungsphase dauerte hier ebenfalls nur 2 Tage.

TABELLE I

Zeit in Stunden	mg Milchsäure in 100 ml ohne Zusatz	mg Milchsäure in 100 ml mit Aspergilluszusatz
23	6.7	9
27	33.8	67.5
44	22.5	33.8
52	15.0	16.65

Die Wirkung des Aspergillusaktivators ist mengenmässig begrenzt und erreicht zwischen 0.2 und 0.5%, auf Pilztrockengewicht berech. t, das Maximum. In einem Gäransatz mit synthetischer Nährösung wurden nach 17 Stunden die Milchsäurewerte der Tabelle II erhalten. Konzentrationen über 0.5% wirkten hemmend.

TABELLE II

Ansatz Aspergillus %	mg Milchsäure/100 ml Nährösung
0.05	15.0
0.1	27.3
0.2	31.6
0.5	34.1
1.0	21.0

Fraktioniert man die in den beschriebenen Versuchen gebildete Milchsäure derart, dass man mit Bariumacetat und Alkohol bei schwach lackmussaurer Reaktion eine Fällung vornimmt, dann findet man in dieser Bariumfällung nach alkalischer Verseifung ebenfalls Milchsäure. Diese Fällung kann aber keine vorgebildete Milchsäure enthalten, da das Ba-Salz der Milchsäure noch in 75% Alkohol spielend löslich ist. Fällbar mit Barium und Alkohol und zur Milchsäure umgesetzt mit Alkali werden aber von allen Intermediärprodukten bis jetzt nur die Triosephosphorsäuren. Tatsächlich lassen sich auch die annähernden Mengen anorganisches Phosphat nach der Verseifung mit Alkali, hervorrend aus einer alkali-empfindlichen Phosphorsäureverbindung, nachweisen. Es ist also sicher anzunehmen, dass in dieser fällbaren Substanz eine Triosephosphorsäure

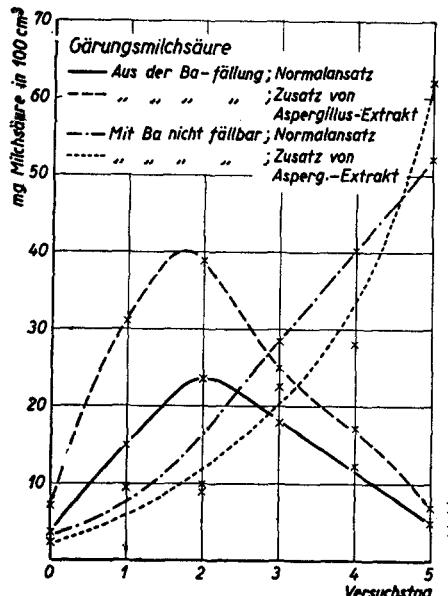


Abb. 3

bei allen Gärungen mit lebender Hefe gefunden. Der grösste Teil wird in der Angärungsphase gebildet.

TABELLE III

Zeit in Tagen	mg Milchsäure/100 ml		mg P ₂ O ₅ gefunden/100 ml		mg P ₂ O ₅ berechnet/100 ml	
	ohne Zusatz	mit Aspergillus	ohne Zusatz	mit Aspergillus	ohne Zusatz	mit Aspergillus
1	14.8	31.2	10.6	22.3	11.7	24.8
2	23.4	38.5	17.3	26.3	18.4	30.4
3	17.4	25.2	10.4	16.9	13.7	19.9

ZUSAMMENFASSUNG

Die Angärungsphase mit intakter Hefe zeigt das Ansteigen einer scheinbaren Milchsäurebildung, die durch Zusatz eines wässrigen *Aspergillus niger*-Extraktes wesentlich gesteigert werden kann. Bei Übergang zur stationären Phase fällt diese Milchsäure bis zu einem während der ganzen Gärung gleichbleibenden Wert ab. Durch Ba-Salzbildung kann man diese Milchsäure in 2 Fraktionen zerlegen, von denen die alkoholunlösliche Ba-Fällung nach ihren Eigenschaften als eine Triosephosphorsäure angesprochen werden muss. Damit scheint bewiesen, dass die Spaltung des Zuckers zu Alkohol auch mit intakter, lebender Hefe ebenso wie beim zellfreien Macerationssaft über Triosephosphorsäure als Zwischenprodukt verläuft. Es ist beliebig unwahrscheinlich, dass die darauffolgenden Reaktionen einen anderen Weg als den in dem Gärungsschema angegebenen einschlagen werden. Die Bildung dieser Triosephosphorsäure ist in der Angärungsphase mit den darauffolgenden Reaktionen nicht synchronisiert, sodass es möglich ist, die vorauselende Bildung dieser Triosephosphorsäure analytisch zu erfassen. In der stationären Phase jedoch liegt, wie zu erwarten war, dieses Zwischenprodukt nicht angereichert vor.

Weiter zeigen diese Versuche auch den Ursprung der bei jeder Hefegärung entstehenden, geringen Mengen Milchsäure. Er liegt hauptsächlich in der Initialphase und steigt langsam bis zu einem konstant bleibenden Wert während des Gärverlaufes an, der für die untersuchten Weinhefen zwischen

30 und 60 mg/100 ml Most liegt. Es ist noch unklar, ob diese Milchsäure aus einer Änderung des Stoffwechsels von der ruhenden zur sprossenden Hefe stammt, oder ob diese Milchsäure als Produkt der vorauselenden Triosephosphorsäurebildung aufgefasst werden muss. Im letzteren Fall würde sie natürlich nicht durch alkalische Verseifung entstanden sein. Sie könnte aber aus dem spontanen Zerfall von Triosephosphat zu Methylglyoxal herrühren. Das Methylglyoxal würde dann durch die Methylglyoxalase in Milchsäure umgewandelt. Damit würde zum ersten Mal diesem Enzym in der Hefe eine Funktion zugewiesen (Siehe hierzu auch K. LOHMANN⁸).

SUMMARY

The initial phase of fermentation with whole yeast shows the onset of an apparent formation of lactic acid, which can be markedly increased by watery extracts of *Aspergillus niger*. On transition to the stationary phase this lactic acid decreases to an amount which remains constant throughout the fermentation. By forming barium salts this lactic acid can be separated into two fractions. One of these, the precipitate which is insoluble in alcohol, is to be regarded as a triose-phosphoric acid, according to its properties. This seems to prove that the decomposition of sugar to alcohol by intact living yeast also proceeds by way of triose phosphoric acid as intermediate, just as in the case of cell-free maceration juice. It is rather improbable that the subsequent reactions would follow another route than has been indicated in the scheme of alcoholic fermentation.

The formation of this triose phosphoric acid has not yet been "synchronized" with the following reactions during the initial phase of fermentation, so the preceding formation of this triose phosphoric acid can be demonstrated analytically. In the stationary phase, however, this intermediate is not present in larger amount, as is to be expected.

These experiments also reveal the origin of the small amounts of lactic acid which are formed during each yeast fermentation. This origin is to be found in the initial phase and the amount of lactic acid gradually increases when the fermentation proceeds until a constant value is attained which is mostly 30–60 mg/100 ml wort for the wine yeasts investigated.

It is not yet clear whether this lactic acid originates from a conversion of the metabolism of resting yeast to that of budding yeast, or whether it must be regarded to be a product of the preceding formation of triose phosphoric acid. In the latter case it would of course not have been formed by alkaline saponification. It could however arise from the spontaneous decomposition of triose phosphate to methylglyoxal. The latter would then be converted into lactic acid by methylglyoxalase. This would be the first time that a function is appointed to this enzyme in the yeast (See also K. LOHMANN⁸).

RÉSUMÉ

La phase initiale de la fermentation avec de la levure intacte montre une augmentation de la formation apparente d'acide lactique qui peut être considérablement accrue par l'adjonction d'un extrait aqueux d'*Aspergillus niger*. Lors du passage à la phase stationnaire la quantité d'acide lactique décroît jusqu'à une valeur qui reste constante pendant toute la durée de la fermentation. Par transformation en sels de barium cet acide lactique apparent peut être séparé en deux fractions; le précipité de barium insoluble dans l'alcool doit être considéré, d'après ses propriétés, comme provenant d'un acide triose-phosphorique. Ceci semble démontrer que la transformation du sucre en alcool se produit sous l'action de la levure intacte vivante, de même que sous l'action d'un extrait exempt de cellules en passant par l'acide triose-phosphorique comme intermédiaire. Il est assez peu probable que les réactions suivantes passent par un autre chemin que celui indiqué dans le schéma de la fermentation alcoolique.

Dans la phase initiale cette formation d'acide triose-phosphorique n'est pas "synchronisée" avec les réactions suivantes et c'est pourquoi il est possible de démontrer son existence analytiquement. Cependant, ainsi que l'on pouvait s'y attendre, ce produit intermédiaire n'est pas accumulé pendant la phase stationnaire.

Ces expériences révèlent de plus l'origine des faibles quantités d'acide lactique rencontrées dans toute fermentation produite par la levure. La formation d'acide lactique commence dans la phase initiale et augmente pendant la fermentation jusqu'à une valeur constante qui est de 30 à 60 mg/100 ml de moût pour les levures de vin examinées.

Cet acide lactique provient-il du passage du métabolisme de la levure au repos à celui de la levure bourgeonnante ou bien est-il un produit de la formation précédente d'acide triose-phosphorique? De toutes façons, dans ce dernier cas, il ne pourrait pas provenir d'une saponification alcaline mais bien d'une décomposition spontanée du triose-phosphate en méthylglyoxale. Ce dernier serait ensuite transformé en acide lactique par le méthylglyoxalase. Ce serait la première fois qu'une onction fût attribuée à cet enzyme dans la levure (voir aussi K. LOHMANN⁸).

LITERATUR

- ¹ O. MEYERHOF UND W. KISSLING, *Biochem. Z.*, 267 (1933) 313.
- ² O. MEYERHOF UND W. KISSLING, *Biochem. Z.*, 281 (1935) 249.
- ³ O. MEYERHOF, W. KISSLING UND W. SCHULZ, *Biochem. Z.*, 292 (1937) 25.
- ^{3a} O. MEYERHOF UND K. LOHmann, *Biochem. Z.*, 271 (1934) 89.
- ⁴ FRIEDEMANN, CONTONIO UND SHAFFER, *J. Biol. Chem.*, 73 (1927) 355.
- ⁵ HENNEBERG, *Handbuch d. Gärungsbakteriologie*, II. Auflage (1926) Seite 50.
- ⁶ K. LOHmann UND JENDRASSIK, *Biochem. Z.*, 178 (1926) 419.
- ⁷ H. v. EULER UND NIELSEN, *Zentr. Bakt. Parasitenk. Abt. II*, 100 (1939) 435.
- ⁸ K. LOHmann, *Biochem. Z.*, 254 (1932) 332.

Eingegangen den 14. März 1949