

### Ein Beitrag zur zellenfreien Gährung.

Von Felix B. Ahrens.

Um in meinen technologischen Vorlesungen Ed. Buchners's chemische Lösung der Gährungsfrage demonstrieren zu können, habe ich dessen Arbeiten nachgemacht und bin bei dem Experimentiren mit dem Hefepresssaft auch zu einigen neuen Ergebnissen gekommen, die ich im Folgenden mittheilen will. Ich bediente mich zur Herstellung des Hefepresssaftes derselben Apparatur und desselben Verfahrens wie Buchner: 1 Theil bei 50 Atm. entwässerte untergährige Bierhefe wurden mit 1 Theil scharfkantigen Quarzpulver und  $\frac{1}{5}$  Theil reiner Kieselguhr gemischt und in einer Reibemühle von Huguershoff-Leipzig zerrieben, bis die Masse eine schmierige Beschaffenheit angenommen hatte. In einem Filtertuche eingeschlagen, wurde dieselbe in einer hydraulischen Presse von Dehne-Halle allmählich einem Druck bis zu 500 Atm. ausgesetzt. Der ablaufende Saft wurde in eisgekühlten Gefässen aufgefangen. Der Presskuchen wurde mit etwas Wasser durchgeknetet, wieder zerrieben und wieder ausgepresst, und es wurde dieselbe Procedur noch mehrmals wiederholt, so dass wir aus 1000 g entwässerter Hefe 700 ccm Saft erhielten. Der rückständige Presskuchen erzeugte in Zuckerlösung immer noch lebhafte Gährungserscheinung, ihn gährtot zu machen scheint auf dem obigen Wege überhaupt nicht möglich; wir haben durch sehr häufige Wiederholungen des Durchknetens mit Wasser und Abpressens den Versuch gemacht, die Hefeflüssigkeit völlig zu gewinnen, aber es ist das nicht geglückt, mit dem schliesslich übrig gebliebenen Presskuchen konnte man immer noch lebhafte Vergährung erzielen.

Wir haben mit Hefen verschiedener Breslauer Brauereien, auch mit selbstgezüchteter Reinhefe und zu verschiedenen Jahreszeiten gearbeitet, immer aber haben wir, nachdem wir die Technik heraus hatten, einen vorzüglich wirkenden Presssaft gewonnen. Die meisten Misserfolge, die sich in der Literatur verzeichnet finden, sind u. E. darauf zurückzuführen, dass die Versuche vorzeitig abgebrochen und als negativ angesehen wurden, ehe die Experimentatoren die nicht

ganz einfache Technik der Herstellung guten Hefepresssaftes in der Hand hatten; auch wir haben zu Anfang unserer Versuche kein brauchbares positives Resultat erhalten, während wir später niemals einen Misserfolg zu verzeichnen hatten. Es scheint uns diese Annahme jedenfalls einfacher als die Buchner's<sup>1)</sup>, nach welcher „in gewissen Lebensperioden, bei gewissen Züchtungsverfahren auch sehr gährkräftige Saccharomyceten vorübergehend keine Zymase zu enthalten scheinen“; wenn es schon etwas unwahrscheinlich ist, dass ein doch zweifellos wichtiger Bestandtheil des Zellinhaltes der Hefe vorübergehend ganz verschwindet, so erscheint es ganz ausgeschlossen, dass die vielen Millionen Hefezellen, die bei der Herstellung auch des kleinsten Quantum Presssaft in Betracht kommen, alle oder doch in überwiegender Mehrzahl sich in einer Lebensperiode befinden, in der die Zymase fehlt. Eine völlige Zerstörung derselben durch Einwirkung proteolytischer Enzyme in der lebenden Zelle ist wohl nicht gut anzunehmen, es dürfte von gesunder Hefe etwa zerstörte Substanz wohl alsbald neugebildet werden. Es ist auch wohl nicht nothwendig, die allmählich sich abschwächende und schliesslich gänzlich verschwindende Gährwirkung eines anfänglich gut wirkenden Presssaftes allein auf die zerstörende Thätigkeit proteolytischer Fermente zu setzen<sup>2)</sup>; der frisch von der Presse ablaufende Saft ist schwach alkalisch, wird aber sehr schnell sauer. Ein filtrirter Presssaft von 1,0182 spec. Gew. zeigte nach dem Stehen über Nacht in Eis 0,305 Proc. Säure (als Milchsäure berechnet); ein anderer filtrirter Saft von 1,054 spec. Gew. zeigte nach Verlauf derselben Zeit 0,81 Proc. Säure (als Milchsäure); nach weiteren 12 Stunden war eine Säurezunahme nicht eingetreten. Es ist nun wohl denkbar, ja bis zu einem gewissen Grade wahrscheinlich, dass diese Säure eine allmähliche Umlagerung in der Molekel der Zymase hervorruft, die zur Auslösung der Reaktion mit Zucker nicht mehr befähigt ist. Nach Beendigung jedes Gährungsversuches mit Presssaft findet sich ein grauer

<sup>1)</sup> Berichte 31, 573.

<sup>2)</sup> A. Geret und Hahn, Berichte 31, 200 u. 2335; Włobrowski, Daselbst S. 3219.

Niederschlag am Boden des Gefäßes und die vorher stark fluorescirende Flüssigkeit zeigt keine Spur mehr von Fluorescenz und auch keine Gährwirkung mehr. Das Verschwinden der Fluorescenz war uns bei unseren Versuchen mit süßer Maische und Bierwürze stets ein sicheres Zeichen für das Ende der Reaktion. Wir halten den die Fluorescenz des Presssaftes bewirkenden Körper für die Zymase und glauben, dass er sich am Ende der Gährung in veränderter Form als Niederschlag ausgeschieden hat. Ob diese Veränderung auf die Reaktion mit dem Zucker oder auf den Einfluss der Säure zurückzuführen ist, bleibt vorläufig offen. Man könnte gegen die Annahme einer Säureeinwirkung einwenden, dass man Hefemaischen absichtlich milchsauer werden lässt, gerade um die Hefe gegen gefährlichere Infektionen zu schützen; indessen ist dieser Einwand hinfällig, denn, abgesehen davon, dass die Hefe vorübergehend unter der Milchsäurewirkung leidet, liegen die Verhältnisse in dieser Beziehung bei der lebenden Hefezelle doch ganz anders als bei dem Presssaft. Wir sind auch der Ansicht, dass der Gährungserreger nicht wirklich gelöst, sondern als Colloid in dem Saft vorhanden ist. Auf seine Gährwirkung geprüfter stark fluorescirender Saft zeigte nach mehrstündigem Stehen in einer Kältemischung aus Schnee und Kochsalz nach langsamem Aufthauen einen Niederschlag und darüber eine klare, nicht fluorescirende Flüssigkeit, die keine Gährwirkung mehr hervorrief.

Es schien interessant, mit Hefepresssaft Bierwürzen und süße Maische zu vergären. Ein Versuch mit filtrirtem und sterilisirtem Saft, wie er direct aus der Presse ablief, und Lagerbierwürze fiel sehr wenig befriedigend aus. Es war offenbar die Mischung zu verdünnt, um eine lebhaftere Reaktion zu ermöglichen. Wir versuchten daher den Presssaft zu concentriren. Die Buchner'sche Methode — Abdestilliren des Wassers im Vakuum bei 25—30° und Eintrocknen des concentrirten auf Glasplatten gestrichenen Rückstandes im Exsiccator — hat uns wenig Freude gemacht. Wir versuchten, den Presssaft direct auf flachen Schalen in dünner Schicht ausgebreitet, im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure einzutrocknen. Der erhaltene Rückstand war gelb, spröde und hygroskopisch; er besass frischen Hefegeruch und löste sich in Wasser langsam auf. Die Lösung zeigte indessen keine Gährwirkung mehr. Die Zusammensetzung dieses Trockenrückstandes wurde ermittelt zu 10,05 Proc. Asche, 40,87 Proc. C, 6,7 Proc. H, 9,56 Proc. N; rechnet man die drei letzten Zahlen

auf aschenfreie Substanz um, so erhält man 45,4 Proc. C, 7,5 Proc. H, 10,64 Proc. N.

In vorzüglicher Weise glückte die Concentration des Presssaftes durch Ausfrieren. Der Saft wird in eine Kältemischung gebracht und nicht tiefer als auf —2° abgekühlt; durch jeweiliges Umrühren sorgt man für das Entstehen von Eisbrei. Man schüttet dann die breiige Masse auf ein abgekühltes Tuch und presst schnell und kräftig aus. Das rückständige Eis enthält nur minimale Mengen Saftsubstanz. Wir erhielten auf diese Weise z. B.

aus 190 ccm Saft von 1,0378 spec. Gew. bei 12° (ca. 9,4° Brix) 75 ccm Saft von 1,0540 spec. Gew. bei 12° (ca. 13,3° Brix).

Um den bei wiederholtem Ausfrieren und Abpressen gewonnenen Vorthail zu zeigen, dienen folgende Angaben:

	Saft-Quantum	Farbe	Spec. Gew.	° Brix
1	640 ccm	hellgrau, durchscheinend	1,0283	8
2	500 -	dunkelgrüngrau undurchsichtig	1,0367	9,09
3	—	—	1,0460	11,4
4	185 -	—	1,0604	14,8

Die höchste Concentration, welche wir auf diese Weise hergestellt haben, zeigte das spec. Gew. 1,0765 bei 14° = 18,5° Brix. Mit diesen concentrirten Säften konnten wir unsere Versuche vorzüglich durchführen, sie eignen sich auch besonders zur Demonstration, da sie in Bierwürze bei Zimmertemperatur bereits nach ca. 10 Minuten gleichmässige Kohlensäureentwicklung hervorrufen.

#### I. Versuch. Es wurde angesetzt

50 ccm Bockwürze von 19,4° Brix  
50 - Presssaft - 9,9° Brix.

Das Gemisch zeigte 14,9° Brix. Die Gährung, die bei ca. 18° stattfand, verlief sehr lebhaft und war nach 3 Tagen bereits beendet: die Fluorescenz war verschwunden, die Flüssigkeit war fast völlig klar, braunschwarz, es hatte sich ein graubrauner Niederschlag abgesetzt. Die vergohrene Würze spindelte 10,3° Brix, enthielt 3 Vol. Proc. Alkohol, 4,3 Proc. Maltose, 4,68 Proc. Stickstoffsubstanz. Der Vergährungsgrad berechnet sich zu 30,8. Indessen hat diese Zahl nicht dieselbe Bedeutung wie bei der Gährung mit Hefe, weil in unserm Falle das Verhältniss Maltose : Nichtmaltose zu Gunsten der letzteren sehr wesentlich verschoben ist; es gilt das in gleicher Weise für die folgenden Versuche. Erwähnt sei noch, dass sich hier wie in den folgenden Versuchen bei der Alkoholdestillation Eiweissgerinnsel abschied.

## II. Versuch: Angesetzt wurden

172,5 ccm Lagerbierwürze von 19,4° Brix  
172,5 - Hefesaft - 15,7° Brix.

Das Gemisch zeigte 18° Brix. Die Gährung verlief bei Zimmertemperatur im offenen Kolben lebhaft; auch hier fiel das Verschwinden der Fluorescenz mit dem Ende der Reaction zusammen; das Bier hatte eine prächtige Farbe und war blank. Es wurde nach etwa 8 wöchentlichem kühlem Lagern untersucht. Das Kohlendioxyd war bei dem Stehen im offenen Kolben bei der hohen Zimmertemperatur fast völlig entwichen; da bei dem Lagern in den Verschlussflaschen eine Nachgährung nicht stattfinden konnte, so fehlte bei der Untersuchung des Bieres das Kohlendioxyd fast ganz. Das Bier schmeckte sauer und scharf und zeigte einen eigenthümlichen Geruch. In der folgenden Tabelle sind die gefundenen Procent-Zahlen zum Vergleich neben die Analysenergebnisse eines Spatenbräu-Exportbieres gesetzt:

	Versuchs- bier	Spatenbräu
Spec. Gew. . . . .	1,0556	1,020
Extract d. Stammwürze . . . . .	21,4	14,71
Alkohol . . . . .	2,43	3,94
Flüchtige Säure . . . . .	0,03	0,01
Milchsäure . . . . .	0,726	0,16
Extract . . . . .	16,3	6,72
Maltose . . . . .	5,6	2,06
N-Substanz . . . . .	5,556	0,41
Asche . . . . .	1,2544	0,209
Vergährungsgrad . . . . .	23,6	54,3

Extract, N-Substanz, Asche- und Säure-Gehalte sind gegenüber dem Spatenbräu ungeheuer hoch; doch ist das nicht auffallend, denn alle dabei in Frage kommenden Substanzen sind durch den concentrirten Hefesaft in die Würze gebracht und in dem Biere geblieben.

## III. Versuch. Angesetzt wurden

70 ccm Hefesaft von 1,0765 spec. Gew. bei 18°  
105 - Bierwürze - 1,0809 - - - 18°.

Die stark fluorescirende Mischung wurde in einer Flasche mit Patentverschluss vergähren gelassen. Das spec. Gew. der 175 ccm Mischung war 1,0779 bei 14°. Die Reaction trat schnell ein und nahm normalen Verlauf; jeden Tag wurde durch vorsichtiges kurzes Öffnen die Kohlensäure z. Th. abgelassen; es war stets starker Druck in der Flasche. Die Gährung vollendete sich auch in der Kohlensäureatmosphäre in gewohnter Weise. Nach Beendigung der Reaction wurde das Bier auf 0° einige Zeit abgekühlt und dann auf kleine Flaschen abgezogen und lagern gelassen. Das schliessliche Product war in Farbe, Geruch und Geschmack dem Biere von Versuch II gleich, nur enthielt es reichliche Mengen von Kohlensäure.

Ein Genuss war indessen auch dieses Bier nicht!

IV. Versuch. 30 g Stärke werden mit 100 ccm Wasser verkleistert und mit 25 g Darmmalz verzuckert; die süsse Maische hat 1,093 spec. Gew.; 50 ccm derselben, völlig klar filtrirt, werden mit 50 ccm Presssaft versetzt, so dass 100 ccm Mischung von 1,0723 spec. Gew. = 17,5° Saccharometer resultiren; dazu werden 0,2 ccm Toluol gefügt.

Die Gährung setzt normal ein und nimmt anfangs einen flotten Verlauf bei 18°. Es wurde dann die Zimmertemperatur allmählich bis auf 5° sinken gelassen, wodurch eine derartige Verzögerung des Gährungsverlaufes herbeigeführt wurde, dass die Reaction erst nach 17 Tagen beendet war. Auch bei diesem Versuche trat mit abnehmender Fluorescenz ein grauer Niederschlag ein; am Ende der Reaction war die Flüssigkeit klar und ohne jede Fluorescenz.

Die vergohrene Maische zeigte 1,0577 spec. Gew. bei 14° = 14,1° Saccharometer, einen Alkoholgehalt von 5,39 Vol. Proc. und einen Vergährungsgrad von 19,4. Auch hier trat bei dem Abdestilliren des Alkohols Eiweissgerinnsel auf.

Der graue Niederschlag, der bei den Würzevergähren durch Würzesubstanz verunreinigt war, konnte hier bei dem Maischeversuch als frei von derartigen Verunreinigungen angesehen werden; er wurde deshalb durch vielfache Dekantation und schliesslich auf dem Filter mit Wasser möglichst ausgewaschen und an der Luft getrocknet. So wurde 0,22 g einer spröden, bräunlich-grauen Substanz gewonnen; dieselbe enthielt 9,3 Proc. Asche 41,75 Proc. C 6,87 Proc. H oder auf aschefreie Substanz umgerechnet 45,99 Proc. C 7,58 Proc. H.

Es wurden in verschiedenen Presssäften Fällungen vorgenommen, theils mit Zinksulfat, theils mit Alkohol. Die Niederschläge wurden mit Wasser möglichst gut ausgewaschen, dann mehrfach mit Alkohol übergossen und getrocknet.

1. Frischer Presssaft wurde ausgefroren, das flüssig gebliebene abgossen (1a), dann das Eis aufgethaut (1b). Beide Flüssigkeiten wurden mit festem Zinksulfat versetzt und letzteres durch Umschwenken gelöst. Von den entstandenen Fällungen wurde die überstehende Flüssigkeit abgossen und die Niederschläge durch Dekantation mit Wasser so lange gewaschen, bis in demselben keine Schwefelsäure mehr nachweisbar war. Geringe Mengen der Niederschläge gingen in Lösung und blieben beim Abdunsten des Lösungsmittels als gelbe, amorphe, stark

zinkhaltige Masse zurück. Die trocknen Niederschläge stellen graue hornartige Massen dar.

2. Ein concentrirter Saft wird mit Zink-sulfatlösung fraktionirt gefällt; schon die erste vorsichtige Gabe fällt fast Alles aus. Der wie oben behandelte und an der Luft getrocknete Niederschlag besteht z. Th. aus grauen (2a), z. Th. aus weissen (2b) hornartigen Stücken.

3. Ein Presssaft wird mit Alkohol gefällt; der Niederschlag abfiltrirt und auf dem Filter mit Wasser behandelt; es geht ein Theil in Lösung und wird aus dieser wiederum durch Alkohol gefällt. Der von Wasser nicht gelöste Theil bildet eine gelbe, spröde Masse (3a), der lösliche Theil ein weisses Pulver (3b).

4. Concentrirter Presssaft wird fraktionirt mit Alkohol gefällt; die erste Fällung liefert nach dem Auswaschen und Trocknen eine graue (4a), die zweite Fällung eine gelbe, spröde Masse (4b).

5. Es wird aus Saft von 1,054 spec. Gew. durch ungenügende Alkoholfällung ein Niederschlag — der allerdings den grössten Theil des Fällbaren ausmacht — hervorgerufen; derselbe wird nach 24 Stunden abfiltrirt und mit Wasser gut gewaschen. Eine Probe des Niederschlages wird in Bierwürze suspendirt, es treten keine Gährungserscheinungen auf. Der Niederschlag wird auf dem Filter mit Ammoniak behandelt, wobei der grösste Theil desselben in Lösung geht; die Lösung wird klar filtrirt und mit sehr verdünnter Milchsäure gefällt. Der entstandene Niederschlag wird mit Wasser, verdünntem und absolutem Alkohol ausgewaschen, dann an der Luft und bei ca. 50° getrocknet. Es bleibt eine spröde graubraune Masse.

## Zur Titerstellung der Normalsäuren.

Von Herm. Thiele und R. Richter.

Von den zahlreichen Körpern, die zur Titerstellung der Normalsäuren benutzt worden sind, ist wohl immer das reine kohlen-saure Natron der am meisten angewandte Körper gewesen. Durch die Arbeit von Kissling<sup>1)</sup> sind wir über das Verhalten dieses Körpers beim Erhitzen aufgeklärt worden, sodass die Fehler, welche früher in Folge zu starken Erhitzens dieses Salzes des öfteren gemacht worden sein mögen, jetzt nicht mehr in Betracht kommen. Trotzdem erscheint es wünschenswerth, einen Körper zu besitzen, der eine Controle der so erhaltenen Werthe gestattet. — Am meisten wurde zu diesem Zwecke bisher wohl die directe Fällung des negativen Jons als  $\text{Ag}_2\text{Cl}_2$  und  $\text{BaSO}_4$  benutzt. Diese Methoden sind wegen der Löslichkeit der betreffenden Salze und bei der Baryumfällung noch aus anderen Gründen mit immerhin merklichen Fehlern behaftet. Im Übrigen ermittelt man ja durch diese Methoden nicht direct die acidimetrische Äquivalenz, sondern nur die Menge des betreffenden säurebildenden Bestandtheils, sodass für deren Anwendung noch die allerdings meist nicht schwer zu erfüllende Bedingung der Verwendung von reinen Säuren hinzutritt.

Die Auswahl unter den leicht rein zu erhaltenen alkalischen Körpern ist aber leider keine sehr grosse. Der von Medicus vorgeschlagene reine kohlen-saure Kalk genügt anscheinend allen billigen Anforderungen, da er einestheils so gut wie völlig unhygroskopisch ist und anderentheils die leicht handelserhältlichen glasklaren Spaltstücke des isländischen Doppelspathes genügende Gewähr für Reinheit zu bieten scheinen. Um

Laufende No.	Proc.						Nach Abzug der Asche			Bemerkungen
	C	H	N	P	S	Asche	Proc. C	Proc. H	Proc. N	
1 a	29,94	5,40	9,53	—	—	26,81	40,89	7,40	13,23	Die Asche enthält sehr viel Zn
1 b	26,17	4,95	9,27	—	—	33,59	39,40	7,40	13,96	
2 a	22,30	4,86	7,84	—	—	35,30	34,63	7,50	12,10	
2 b	27,81	4,80	7,98	—	—	—	—	—	—	ebenso
3 a	37,20	6,80	—	—	—	—	—	—	—	ebenso
3 b	34,90	6,70	—	—	—	—	—	—	—	
4 a	43,84	7,30	13,40	1,60	—	3,50	45,49	7,60	13,70	Die Asche enthält 35,6 Proc. $\text{P}_2\text{O}_5$
4 b	39,34	6,95	8,20	2,80	0,95	8,30	42,80	7,58	9,07	
5	47,30	6,90	13,00	—	—	2,02	48,54	7,10	13,20	

Die vorstehende Tabelle, zu der einen Commentar zu geben verfrüht erscheint, enthält die Resultate der Analysen der unter 1—5 beschriebenen Fällungen.

Breslau im April 1900.

so auffälliger war es für uns, dass die nach den erwähnten Methoden ausgeführten Titerstellungen eine genügende Übereinstimmung nicht ergaben und vielleicht veranlasst es gerade dieser Umstand, dass die etwas ausführliche Mittheilung der erhaltenen Resultate nicht ganz uninteressant ist.

<sup>1)</sup> Zeitschr. für angewandte Chemie 1899, 332.