

182. Eduard Buchner und Rudolf Rapp: Alkoholische Gährung ohne Hefezellen.

[5. Mittheilung¹⁾.]

(Eingegangen am 25. April.)

Die Angaben über zellenfreie Gährung haben, abgesehen von der zustimmenden Haltung von M. E. Duclaux, länger als ein Jahr in der Literatur nur ablehnende Beurtheilung und Nachprüfungen mit negativem Ergebniss gefunden. Den früher erwähnten Gegnern schliesst sich mit einer anscheinend sehr sorgfältig ausgeführten Untersuchung J. Reynolds Green-London an²⁾, welcher beim Lösen von Zucker in Presssaft aus Cambridger obergähriger und aus Tottenhamer untergähriger Bierhefe keine Kohlendioxydentwicklung bemerkte; überflüssiger Weise wird ausserdem noch festgestellt, dass auch keine Alkoholbildung stattfand und sich das spec. Gewicht nach mehreren Tagen nicht veränderte. Eine Verbesserung des Zerreibungs- und Auspress-Verfahrens, sowie Wechsel in der angewandten Hefe wären gewiss zweckentsprechender gewesen. Als Schlussresultat heisst es: »die englischen Hefen enthalten jedenfalls kein Gährung erregendes Enzym«; es ist aber kaum wahrscheinlich, dass sie die Gährung auf anderem Wege besorgen als die deutschen³⁾. Eine Kritik, die zahlreiche Entstellungen und sogar thatsächlich unrichtige Angaben enthält, stammt von C. Wehmer-Hannover⁴⁾. Dieselbe wurde nach Erscheinen unserer dritten, sehr ausführlichen Mittheilung verfasst und bringt keine eigenen Versuche. Es ist schwer begreiflich, dass es heute noch einen Naturforscher giebt, welcher so wenig Achtung vor dem Experimente besitzt.

Erst aus neuester Zeit liegt eine Aeussierung von Max Delbrück⁵⁾ vor, welcher unter Wiederrufung seiner früheren Angaben nunmehr gemeinsam mit Lange unsere Ergebnisse in jeder Richtung bestätigt.

Quantitative Alkohol- und Kohlensäure-Bestimmungen.

Schon früher⁶⁾ wurde in drei Versuchen der durch zellenfreie Gährung entstandene Alkohol und beim letzten derselben auch die gebildete Kohlensäure quantitativ ermittelt. Es liegen nun einige weitere derartige Bestimmungen vor. Die Anordnung der Apparate

¹⁾ Wie die früheren, wurden auch vorliegende Untersuchungen im hygienischen Institut der Universität München ausgeführt.

²⁾ Annals of Botany 9 (1897), 555.

³⁾ Zwei weitere abfällige Urtheile sind uns bisher nur dem Namen nach bekannt geworden: Petit-Nancy, Moniteur vinicole 1897, No. 51; Monier, Gazette medicale de Liège, 18. Juni 1897.

⁴⁾ Botanische Zeitung 1898, No. 4, 53.

⁵⁾ Wochenschr. f. Brauerei 15 (1898), 133; Zeitschr. f. Spiritusindustrie 21 (1898), 107; deutsche Essigindustrie 2 (1898), 91.

⁶⁾ Diese Berichte 30, 123, 2669.

war ungefähr die von Soxleth und Jodlbauer ¹⁾ empfohlene. Das geräumige Gährgefäss, in ein Wasserbad von 15—17° eingesenkt, steht durch einen Kühler mittels Quecksilberschlusses mit einem grossen U-Rohr in Verbindung, das mit concentrirter Schwefelsäure befeuchtete Glasstücke enthält. Daran schliesst sich ein Erlenmeyer-Kolben mit 50 ccm einer Kalilauge (1:1), ferner ein Aetzkali- und ein Chlorcalcium-Rohr. Durch das ganze System wurde während der Versuchsdauer kohlendioxydfreie Luft geleitet. Zur Anwendung kamen immer 100 ccm frischer Hefepresssaft und 26 g Rohrzucker unter Zusatz von 2 pCt. As_2O_3 (als AsO_2K). Bei Unterbrechung der Versuche wurde auf 50° erhitzt und gleichzeitig eine Stunde Luft durchgeleitet.

4. Versuch. Zeitdauer 24 Stunden. Erhalten 8.9 g Kohlensäure und 8.9 g Alkohol (von letzterem ist der in 100 ccm Presssaft nach 3 verschiedenen Bestimmungen durchschnittlich vorhandene Alkohol von 0.5 g bereits abgezogen).

5. Versuch. Zeitdauer 17 Stunden. Erhalten 8.4 g Kohlensäure und 8.3 g Alkohol (davon ist der in 100 ccm desselben Presssaftes durch directe Bestimmung ermittelte Gehalt von 0.5 g Alkohol bereits abgezogen).

Nach den Resultaten von Jodlbauer liefern 100 g Rohrzucker bei der Gährung mit Hefe 51.1 g Alkohol und 49.0 g Kohlensäure, zusammen also 100.1 pCt. ihres eigenen Gewichtes. Bei den Versuchen 4 und 5 war offenbar lange nicht aller Zucker vergohren und es liessen sich thatsächlich noch grosse Mengen nachweisen. Die directe Bestimmung derselben nach Allihn gab aber selbst nach Entfernung des Haupttheiles der Eiweissstoffe durch Zusatz von Salzsäure und Quecksilberchlorid Zahlen, welche um einige Gramme hinter der Differenz zwischen Zuckergewicht und der Summe der Gewichte der Gährproducte zurückbleiben. Im Presssaft sind demnach Substanzen, welche Kupferoxydul in Lösung halten. Vielleicht lässt sich hier zweckmässiger die Gährungsprobe zur Bestimmung des rückständigen Zuckers verwenden. Bessere Resultate wurden ferner erzielt, als die Versuche so lange in Gang blieben, bis sämmtlicher Zucker verschwunden war ²⁾.

6. Versuch. 100 ccm Presssaft mit 26 g Saccharose und Kaliummetarsenit wie oben. Temperatur 15°. Nach 23 Stunden war aller Zucker vergohren. Erhalten 12.2 g Kohlensäure und 12.4 g Alkohol (davon sind bereits 0.6 g Alkohol abgezogen, welche in 100 ccm desselben frischen Presssaftes vor dem Gährversuch direct ermittelt wurden).

Die Differenz zwischen Zuckergewicht und Summe der Gährproducte beträgt bei Versuch 6 nur mehr 1.4 g. Es sollen noch ein Paar solcher Bestimmungen ausgeführt und festgestellt werden, ob auch bei der zellenfreien Gährung Glycerin- und Bernsteinsäure-Bildung auftritt.

¹⁾ Ztschr. ges. Brauwesen 1888, 252.

²⁾ Ein derartiger Versuch ist bereits erwähnt diese Berichte 31, 572.

Bemerkt sei, dass die für obige Bestimmungen etwa denkbaren Fehlerquellen, wie a) spontane Kohlensäureentwicklung z. B. aus den Eiweisskörpern des Presssaftes, b) Kohlendioxydbildung in Folge Vergärung von im Presssaft vorhandenem Glykogen, c) starke Kohlensäureentwicklung beim Gerinnen des Presssaftes in Folge Erhitzen desselben auf 50° bei Unterbrechung der Versuche, thatsächlich kaum in Betracht kommen; denn eine Erscheinung nach a) tritt bei den angewandten Temperaturen nicht ein (Beweis: die Versuche No. 24, 25, 28, 29¹⁾ etc.), b) in der angewandten Münchener untergährigen Bierpresshefe ist gewöhnlich nur sehr wenig Glykogen vorhanden, c) wie ein besonderer Versuch lehrte, liefern 100 ccm frischer Presssaft rasch auf 50° und dann innerhalb 15 Minuten zum Kochen erhitzt bei fortwährendem Luftdurchleiten nur 0.07 g CO₂. Die im Presssaft von vornherein gelöste Kohlensäure wurde aber bei den vorliegenden quantitativen Bestimmungen durch 7—10-maliges Evacuiren des Saftes an der Wasserluftpumpe vor Beginn der Versuche möglichst entfernt.

Presssaft aus kürzer und länger gewässert Hefe.

Die schon früher auf Grund von Experimenten ausgesprochene Vermuthung, dass die Zymase aus den Zellen durch Wasser wohl kaum ausgezogen werden kann (s. Versuche 21, 22 und 23, diese Berichte 30, 2676), wird durch folgende Ergebnisse bestätigt. Frische Münchener untergährige Bierhefe, wie sie zur Presshefefabrication Anwendung findet, wurde direct aus der Brauerei entnommen, gesiebt und zweimal mit sehr viel Wasser geschlemmt, was im Ganzen etwa 2 Stunden dauerte; der Presssaft daraus diente für die Versuche 75 und 76. Andererseits wurde dieselbe Hefe ebenso behandelt, dann aber nochmals mit sehr viel Wasser 18 Stunden stehen gelassen, vom Wasser getrennt und auf Presssaft verarbeitet (Versuche 77 und 78). Ein Unterschied in der Gährwirkung beider Presssäfte ist nicht zu constatiren.

Tabelle XIII.

Je 20 ccm Saft, 8 g Saccharose, 2 pCt. As₂O₃ gelöst in wässriger K₂CO₃ (1 K auf 1 As). 14°.

No.	Hefe	Kohlendioxyd in g nach Stunden				
		16	24	40	64	
					Kohlensäure- verdrängung ohne	mit
75	2 St. gewässert	0.74	0.85	0.91	0.93	1.01
76		0.70	0.81	0.87	0.89	—
77	20 St. gewässert	0.70	0.84	0.88	0.91	0.98
78		0.72	0.85	0.89	0.91	—

¹⁾ Diese Berichte 30, 2676.

Presssaft aus gewaschener und ungewaschener Bierhefe.

Für die Darstellung von Presshefe bestimmte Brauereihefe wurde bei den Versuchen 79—82 direct auf Presssaft verarbeitet, bei 83—86 erst nach 17 Stunden langem Auswaschen und Wässern. Bei der Hälfte der Versuche erfolgte Zusatz von 2 pCt. As_2O_3 (als As_2O_3K). Das Auswaschen ist in den Versuchen ohne Arsenitzusatz von kaum bemerkbarem Einfluss, bei nachträglichem Arsenitzusatz merkwürdig förderlich.

Tabelle XIV.

Je 20 ccm Saft, 8 g Saccharose, 15°.

No.	Hefe	As_2O_3 pCt.	Kohlendioxyd in g nach Stunden					
			16	40	64		112	
					Kohlendioxyd- verdrängung ohne	mit	Kohlendioxyd- verdrängung ohne	mit
79	ungewaschen	—	0.17	0.45	0.69	—	1.01	1.10
80		—	0.17	0.44	0.68	—	1.03	—
81		2	0.39	0.60	—	0.72	—	—
82		2	0.40	0.58	—	—	—	—
83	gewaschen	—	0.20	0.51	0.77	—	1.82	1.34
84		—	0.20	0.50	0.76	—	1.17	—
85		2	1.00	1.13	—	1.25	—	—
86		2	1.00	1.13	—	—	—	—

Tabelle XV. Zusatz von Essigsäure.

Je 20 ccm Saft, 8 g Saccharose, 8 ccm verd. Essigsäure, kein Arsenit, 15°.

No.	Essigsäuregehalt	Kohlendioxyd in g nach Stunden		
		16	40	64
87	(Controlle)	0.15	0.40	0.55
88	0.06 pCt.	0.11	0.82	0.50
89	0.13 pCt.	0.09	0.28	0.42

Wirkung verschiedener Salzzusätze.

Darüber liegen vorläufig nur einige qualitative Versuche vor, welche zeigen, dass eine etwa 10-procentige Lösung von Rohrzucker in Presssaft auch bei Zusatz von 2.2 pCt. Ammoniumsulfat, oder Ammoniumnitrat, oder Ammoniumchlorid, oder Ammoniumazimid nach 3 Stunden in starke Gärung geräth. Bei Ammoniumsulfat hindert selbst ein Zusatz von 6.7 pCt. nur wenig. Ganz anders verhält sich Ammoniumfluorid, von welchem schon 0.55 pCt. genügen, um die Gärung zu unterdrücken, wobei in der Flüssigkeit im Gegensatz zu den übrigen Salzen starke Trübung auftritt; dieses Verhalten

dürfte vielleicht bei Anwendung von Fluoriden in der Spiritusindustrie zu berücksichtigen sein.

Die geringe Schädlichkeit der Salze der Stickstoffwasserstoffsäure beweist von Neuem, dass es sich bei der Gährkraft des Presssaftes nicht um die Wirkung von niederen Organismen handelt, denn Natriumazoimid unterdrückt z. B. schon in Lösung von 0.1 pCt. das Wachstum von Spross- und Schimmel-Pilzen¹⁾. Wir haben einige quantitative Versuche ausgeführt, um die Salze des Azoidids eventuell bei weiteren Gährversuchen als Antiseptica verwenden zu können.

Tabelle XVI. Wirkung von Natriumazoimid.

20 ccm Saft, 8 g Saccharose, 15°.

No.	Natriumazoimid	Kohlendioxyd in g nach Stunden			
		16	24	40	64
90	—	0.32	0.47	0.75	1.12
91	0.36 pCt.	0.27	0.37	0.64	0.94
92	0.71 „	0.22	0.33	0.52	0.74

Zusatz von Toluol als Antisepticum.

Die Zugabe von Natriumarsenit zu gährendem Presssaft hat in manchen Fällen zu unregelmässigen Nebenwirkungen geführt, über die unten berichtet wird. Wir haben deshalb an seiner Stelle neustens des Toluols bedient, welches z. B. von E. Fischer und P. Lindner häufig verwendet wurde; es ist ohne wesentlichen Einfluss auf die Wirkung des Presssaftes und besitzt, wie uns ein besonderer, hier nicht aufgeführter Controllversuch zeigte, genügende antiseptische Kraft.

Tabelle XVII. Toluol als Antisepticum.

Je 20 ccm Saft, 8 g Saccharose, 15°.

No.		Kohlendioxyd in g nach Stunden				
		16	24	40	64 Kohlensäure- verdrängung ohne mit	
93	1 pCt. Toluol	0.40	—	0.86	1.05	1.17
94	„ „	0.37	—	0.79	1.02	—
95	ohne Zusatz	0.31	0.48	0.74	—	—
96	1 pCt. Toluol	0.26	0.43	0.71	—	—
97	2 pCt. As_2O_3 (als AsO_3K)	0.89	1.00	1.03	—	—

¹⁾ O. Löw, diese Berichte 24, 2947; A. Schattenfroh, Arch. f. Hyg. 27, 231.

Unregelmässige Wirkung von Arsenitzusatz.

Die Anwendung von Kaliummetarsenit als Antisepticum hat uns vielfach sehr gute Dienste geleistet; allmählich aber sind wir auf einige Fälle gestossen, wo Zusatz von 2 pCt. dieser Substanz die Gährwirkung des Presssaftes völlig unterdrückte. Diesen merkwürdigen Einfluss können wir vorläufig nicht erklären, er verdient aber vielleicht umsomehr Interesse. Bisher ist eine solche unregelmässige Wirkung des Arsenits in folgenden Fällen constatirt:

1. Die Gährung von Glucose, Galactose und den complicirteren Zuckern, welche bei der Hydrolyse ausschliesslich Glucose liefern, nämlich von Maltose und Glykogen, mittels Presssaft wird durch Arsenitzusatz verhindert. Dagegen vergäht unter gleichen Umständen Saccharose, dann ein äquimolekulares Gemenge von Glucose und Fructose oder auch von Glucose und Saccharose sehr rasch, sodass also der Zusatz des zweiten Kohlenhydrats die ungünstige Wirkung des Arsenits auf die Glucose aufhebt. Auch Fructose vergäht bei Kaliummetarsenitzusatz beträchtlich langsamer, als ohne dasselbe; der Unterschied ist aber viel weniger gross, als bei den ersterwähnten Aldosen. Wir hielten daher eine Oxydationswirkung der letzteren auf die arsenige Säure für die Ursache des ganzen Phänomens; nachdem sich aber gezeigt hat, dass dabei etwa entstehendes arsensaures Salz die zellenfreie Gährung durchaus nicht unterdrückt, muss diese Vermuthung verworfen werden. — Zahlenbelege für Arsenitwirkung auf zellenfreie Glucosegährung u. s. w. sind in der folgenden Abhandlung enthalten (Tab. XX und XXI).

Tabelle XVIII. Einfluss von Monokaliumarsenat.
Je 20 ccm Presssaft, 8 g Saccharose, 12°.

No.		Kohlendioxyd in g nach Stunden			
		16	24	40	64
58	ohne Zusatz	0.16	0.24	0.42	0.73
54	2 pCt. As_2O_3 (als AsO_3K)	0.35	0.37	0.38	0.40
98	2 pCt. As_2O_3 (als AsO_4H_2K)	0.19	0.31	0.57	1.01

2. Eine Unterdrückung der Gährthätigkeit gegenüber Saccharose in Folge Arsenitzusatz tritt ein, falls die zur Herstellung des Presssaftes verwandte Münchener untergährige Bierhefe einige Tage bei 5–10° lagerte. Diese auffällige Thatsache ist durch zwei ausführlichere Versuchsreihen (Tab. XIX) festgestellt. Wahrscheinlich muss die Unwirksamkeit des Presssaftes der Versuche 24 und 25 (Tabelle V, diese Berichte 30, 2676) auf die gleiche, damals noch nicht vermuthete Ursache zurückgeführt werden.

Tabelle XIX. Presssaft aus gelagerter Hefe und Arsenit.

Je 20 ccm Presssaft, 8 g Saccharose, 15°.

No.	Hefe	As ₂ O ₃ (als AsO ₃ K)	Kohlendioxyd in g nach Stunden			
			16	40	64 Kohlensäure- verdrängung ohne mit	
99	frisch auf Presssaft verarbeitet	—	0.24	0.57	0.85	—
100		—	0.25	0.57	0.86	—
101		2 pCt.	0.87	0.95	0.96	1.05
102		2 pCt.	0.87	0.95	0.98	—
103a	nach 4 Tagen Lagern bei 5—10° verarbeitet	—	0.30	0.70	1.04	—
104a		—	0.30	0.71	1.05	—
103b		2 pCt.	0	0	0	0.006
104b		2 pCt.	0	0	0	—
83	frisch auf Presssaft verarbeitet	—	0.20	0.51	0.77	—
84		—	0.20	0.50	0.76	—
85		2 pCt.	1.00	1.13	—	1.25
86		2 pCt.	1.00	1.13	—	—
105	nach 8 Tagen Lagern bei 7—10° verarbeitet	—	0.17	0.37	0.43	0.50
106		—	0.11	0.35	0.42	—
107		2 pCt.	0	0	0	0.003
108		2 pCt.	0	0	0	—

3. In ähnlicher Weise scheint Arsenitzusatz die zellenfreie Gärung von Saccharose durch längere Zeit dialysirten Presssaft und durch mit Wasser verdünnten Presssaft zu unterdrücken; es liegen darüber vorläufig aber nur wenige Versuche vor.

183. Eduard Buchner und Rudolf Rapp: Alkoholische Gärung ohne Hefezellen.

[6. Mittheilung.]

(Eingegangen am 25. April.)

Presssaft und verschiedene Kohlenhydrate.

Im Folgenden soll die Einwirkung von untergährigem Bierhefepresssaft auf die wichtigsten natürlichen Zucker beschrieben werden. Das Resultat ist kurz dieses: Maltose, Saccharose, *d*-Glucose und *d*-Fructose werden gleich rasch vergohren, Raffinose langsamer, noch träger *d*-Galactose und Glycogen; gährungsunfähig sind für Bierhefepress-