

Die verflüssigte Substanz wurde in ätherischer Lösung mit Pottasche getrocknet und hierauf durch wiederholte Fractionirung im Vacuum gereinigt. Der Vorlauf der Destillation enthielt ein wenig Dimethylanilin, das durch sein Jodmethylat vom Schmp. 216° erkannt wurde. Die Hauptmenge destillirte constant unter 10 mm Druck bei 140–141° und bildete ein in Wasser fast unlösliches, mit Aether mischbares, neutral reagirendes Oel.

0.1277 g Sbst.: 0.3137 g CO₂, 0.0859 g H₂O

C₁₀H₁₃O₂N. Ber. C 66.98, H 7.32.

Gef. » 67.00, » 7.54.

Dass in dem Product der Umlagerung der Methylester des Methylphenylglycins vorliegt, fanden wir bestätigt, als wir durch Addition von Jodmethyl an den Ester und Einwirkung von Silberoxyd¹⁾ daraus das ursprüngliche Betain zurückgewannen, das mittels des charakteristischen Pikrats sicher identificirt werden konnte.

Das Jodmethylat des Methylphenylglycinmethylesters bildet, ähnlich wie das von E. Wedekind²⁾ beschriebene Aethyl-esterderivat, silberglänzende Blättchen, die sich in Wasser und heissem Alkohol leicht, in kaltem Alkohol schwer lösen und bei 98–99° schmelzen.

0.1057 g Sbst.: 0.0768 g AgJ.

C₁₁H₁₄O₂NJ. Ber. J 39.51. Gef. J 36.26.

68. Eduard Buchner und Jakob Meisenheimer: Die chemischen Vorgänge bei der alkoholischen Gährung.

[Aus dem chem. Laborat. der Landwirthschaftl. Hochschule zu Berlin.]

(Vorgetragen in der Sitzung von Hrn. E. Buchner.)

Ueber den Mechanismus der Zuckerspaltung bei der alkoholischen Gährung fehlen bisher experimentell gestützte Anhaltspunkte. Die von Pasteur genauer studirte Bildung von Glycerin und Bernsteinsäure³⁾ giebt darüber keinen Aufschluss, umsomehr, weil bei der zellfreien Gährung diese Producte, wenn überhaupt, so doch nur in äusserst geringer Menge auftreten⁴⁾. Besonderer Anlass, auf weitere

¹⁾ In Widerspruch mit der citirten Veröffentlichung von Zimmermann giebt auch das Esterjodmethylat mit Silberoxyd die neutrale Lösung des Betains.

²⁾ Ann. d. Chem. 318, 109 [1901].

³⁾ Das Auftreten von Bernsteinsäure bei der alkoholischen Gährung wurde zuerst von Carl Schmidt beobachtet.

⁴⁾ E. Buchner und R. Rapp, diese Berichte 34, 1529 [1901]; E. und H. Buchner und Martin Hahn, Die Zymasegährung, München 1903, 220.

Nebenproducte beim Zerfall des Zuckers zu fahuden, war auch dadurch gegeben, dass es bei den allerdings nur wenigen quantitativen Versuchen über zellfreie Gährung bisher niemals gelungen ist, sämmtlichen Zucker in Form von Alkohol und Kohlensäure wieder zu erhalten, sondern dass 13—16 pCt. sich dieser Zersetzung entzogen¹⁾.

Vor allem musste dabei an das Auftreten von Essigsäure gedacht werden, die sich nach Versuchen von Béchamp und von Duclaux in geringer Menge (0.05 pCt. vom Zucker) auch bei der gewöhnlichen Gährung vorfindet²⁾, und an die Bildung von Milchsäure, welche vor Pasteur's Eingreifen als normales Gahrungproduct galt, durch letzteren Forscher aber allerdings bei der Gährung durch reine lebende Hefe nicht aufgefunden werden konnte. Dagegen hatte wieder F. B. Ahrens³⁾ bei Zuckergahrung mit Hefepresssaft das Vorkommen nicht flüchtiger Säure beobachtet und dieselbe, jedoch ohne nähere Identificirung, als Milchsäure in Rechnung gezogen. In der That ist es nunmehr gelungen, sowohl Essigsäure als Milchsäure bei der Zuckergahrung durch Presssaft aus Bierunterhefe nachzuweisen⁴⁾. Auf andere Producte als die erwähnten, ist vorläufig nicht geprüft worden.

Wir haben uns natürlich die Frage vorgelegt, ob die Bildung dieser Säuren nicht auf das Wachsthum lebender Bacterien im Presssaft zurückzuführen sei. Gegen eine solche Annahme spricht Folgendes: Der Presssaft war aus einer Bierhefe dargestellt, welche mikroskopisch keine Bacterien erkennen liess. Bei allen Versuchen wurde ferner 1 pCt. Toluol zugesetzt. Der so preparirte Presssaft blieb, abgesehen von einem Niederschlag, der unter dem Mikroskop keine Bacterien aufwies, sondern aus Eiweissgerinnsel bestand, auch bei längerem Stehen nach Beendigung der Versuche klar. Speciell spricht gegen die Annahme, lebende Milchsurebacterien hätten die Resultate beeinflusst, dass in einigen Fällen auch durch Zusatz von 0.3 pCt. Milchsäure die Neubildung von solcher nicht verhindert wurde, obwohl doch die Milchsurebacterien schon gegen geringe

¹⁾ Vergl. diese Berichte 31, 1805 [1893]; ferner »die Zymasegahrung«, München 1903, 214.

²⁾ Vergl. E. Kayser, die Hefe, deutsche Ausgabe von Meinecke, München 1898, 67.

³⁾ Zeitschr. für angew. Chem. 1900, 483.

⁴⁾ Die ersten Angaben mit sicherer Identificirung der Milchsäure stammen von J. Meisenheimer, Zeitschr. für physiol. Chem. 37, 526 [1903]. Einige Wochen später (31. März) ging uns ein Schreiben des Hrn. J. Stoklasa zu, in welchem ebenfalls auf die Milchsäurebildung bei der Gährung mit Zymase aus Pflanzen- und Thier-Organen hingewiesen wurde. Vergl. auch J. Stoklasa und F. Czerny, diese Berichte 36, 4068 [1903].

Mengen dieser Säure sehr empfindlich sind¹⁾ und 0.47 pCt. Milchsäure die Entwicklung von *Bacillus Delbrücki*, *Bacillus lactis acidii* und *Bact. lactis acidii*, die zu den stärksten Säurebildnern gehören, unterdrückt²⁾; in den vorliegenden Fällen war aber ausserdem auch noch Toluol zugesetzt. Bei mehreren Versuchen verschwand ferner Milchsäure; die durch Bacterienthätigkeit daraus vielleicht entstehende Buttersäure war aber nicht nachzuweisen. Dass die Essigsäurebildung etwa durch Oxydation von Alkohol auf Kosten von Sauerstoff mit Hilfe von lebenden Essigsäurebakterien oder auch mittels Essigsäurebacterienoxydase³⁾ erfolgt sei, wird durch den Mangel an dem nöthigen Sauerstoff ausgeschlossen, der in Folge Anwendung eines Schwefelsäuregährverschlusses selbst ohne Berücksichtigung der fortwährenden Kohlendioxidentwicklung nicht vorhanden war.

Milchsäure bei der zellfreien Gährung.

Die Milchsäure wurde in allen Fällen nach Entfernen der flüchtigen Säuren durch erschöpfendes Ausäthern der stark eingedampften und dann angesäuerten Lösung isolirt, in das lösliche Bleisalz übergeführt und schliesslich als Zinksalz gewogen. Die Resultate controlliren sich vielfach gegenseitig, sodass an der Zuverlässigkeit der Methode nicht zu zweifeln ist. Das Zinksalz wurde in zwei Fällen nochmals umkrystallisirt, ein Theil analysirt, ein anderer im Polarisationsapparat geprüft. Es erwies sich dabei als inactiv, womit seine Eigenschaften (Wassergehalt; die Fällung der wässrigen Lösung durch Alkohol ist amorph und wird erst später krystallinisch) übereinstimmen.

Die ersten Versuche wurden in der Weise angestellt, dass der Milchsäuregehalt zunächst des frischen Presssaftes bestimmt wurde, dann abermals nach viertägigem Stehen ohne oder mit Zuckerzusatz. Der allerdings geringe Milchsäuregehalt des frischen Saftes war bei zwei unter den ersten Versuchsreihen (No. I und III der Tabelle, s. S. 426) alsdann ohne Zuckerzusatz verschwunden, bei Zuckerzusatz gleich geblieben, bezw. auf das Doppelte gestiegen. Aus diesem Ergebniss schliessen wir vor allem, dass die gebildete Milchsäure mit dem Zusatz von Zucker bezw. dem Gährungsvorgang in Beziehung steht und nicht etwa aus den Eiweisskörpern des Saftes abgespalten wird⁴⁾. Da in einer weiteren, zeitlich zwischen den genannten ge-

¹⁾ M. Hayduck, Chem. Centralblatt 1887, 1042.

²⁾ W. Henneberg, Zeitschr. für Spiritusindustrie 1903, No. 22—31.

³⁾ E. Buchner und J. Meisenheimer, diese Berichte 36, 634 [1903].

⁴⁾ Eine solche Vermuthung hat J. Efferont gelegentlich des fünften internationalen Congresses für angewandte Chemie geäussert (Chem. Zeitschr. 2, 578 [1903]).

legenen Versuchsreihe (No. II der Tab.) dieselben drei Parallelversuche alle nur Abwesenheit von Milchsäure ergaben, gingen wir nunmehr zu Milchsäurezusätzen über. Der erste derartige Versuch (No. IV), der im frischen Presssaft nur Spuren von Milchsäure aufwies, ergab nach viertägigem Stehen und Zusatz von 1.5 g inactiver Milchsäure zu 500 ccm Saft völliges Verschwinden derselben. Dagegen zeigte sich bei zwei weiteren Versuchsreihen (No. V und VI) keine Abnahme der zugesetzten Milchsäure, was man vielleicht noch dadurch erklären kann, dass die zugesetzten Mengen zu gross und daher schädlich waren. In die letzten zwei Monate fallen aber drei Versuchsreihen (No. VII, VIII und IX), bei welchen übereinstimmend, ob ohne oder mit Milchsäurezusatz, nach 4 Tagen Milchsäurebildung nachgewiesen werden konnte und jedesmal mit steigendem Milchsäurezusatz die Neubildung von solcher geringer wurde, wohl in Folge des schädigenden Einflusses der Säure.

Während also ohne Zuckerzusatz anfangs in den Hefepresssäften die vorhandene oder zugesetzte Milchsäure nach mehrtägigem Stehen verschwunden war, liess sich mit dem einige Monate später dargestellten Saft beim Lagern weder Zunahme noch Abnahme des Milchsäuregehaltes und endlich abermals einige Wochen hernach regelmässig Neubildung von Milchsäure constatiren. Wir machen dafür eine Veränderung der zur Herstellung des Presssaftes benutzten Hefe verantwortlich, worüber unten Näheres ausgeführt werden soll. Die zuletzt angewandten Presssäfte waren durch auffallend grosse Gährkraft ausgezeichnet.

Alle bisher erwähnten Versuche sind mit Presssaft aus Unterhefe der Berliner Schultheiss-Brauerei ausgeführt, für deren Ueberlassung wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

Nur zu unserer neuesten Versuchsreihe (No. X der Tabelle) kam Presssaft aus Münchener Unterhefe zur Anwendung, wobei sich jedoch ganz ähnliche Resultate ergaben wie bei den letzten drei Versuchsreihen mit Berliner Hefe, nämlich Milchsäurebildung beim Lagern.

In allen den Fällen, wo Milchsäurebildung ohne Zuckerzusatz beobachtet werden konnte, wird dieselbe vermuthlich auf Kosten des nicht unbeträchtlichen Glykogengehaltes des Hefepresssaftes erfolgen, der auch die Ursache des Phänomens der sogen. Selbstgährung des Saftes ¹⁾ darstellt und der Menge nach vollkommen ausreicht, die beobachtete Milchsäurebildung zu erklären.

Als Hauptergebniss der bisherigen Forschungen betrachten wir den Nachweis, dass die Milchsäure bei der Spaltung des Zuckers eine grosse Rolle spielt und wahr-

¹⁾ E. Buchner, diese Berichte 33, 3314 [1900].

scheinlich als Zwischenproduct der alkoholischen Gährung auftritt. Vom Standpunkt des Chemikers aus ist eine solche Annahme von vornherein naheliegend. Bekanntlich entstehen aus Invertzucker bei der Behandlung mit Alkali schon bei 70° 30 pCt. Milchsäure, die als Carbonsäure des Aethylalkohols aufzufassen ist.

Der Zerfall des Traubenzuckers in Alkohol und Kohlendioxyd verläuft nach A. von Baeyer's Hypothese ¹⁾ wahrscheinlich in zwei Phasen. In der Ersten tritt eine Verschiebung von Hydroxylgruppen unter Reduction der einen Kohlenstoffatome und unter Anhäufung von Sauerstoff an den anderen ein. Zu den länger bekannten Fällen von solchen Hydroxylwanderungen, z. B. dem Uebergang von Propylalkohol in Isopropylalkohol unter dem Einfluss von Schwefelsäure verschiedener Concentration und unter Bildung von Propylen als Zwischenproduct, sind in neuerer Zeit noch einige typische getreten. Dahin gehört der Uebergang von Glucose in andere Hexosen durch schwache Alkaliwirkung nach Lobry de Bruyn und van Ekenstein ²⁾ und insbesondere die Bildung von Oxalessigsäure aus Weinsäure unter Wasserabspaltung bei gewöhnlicher bzw. noch niedrigerer Temperatur nach A. Wohl und C. Oesterlin ³⁾, welche Autoren auch auf die Aehnlichkeit dieses Vorganges mit den Gährungserscheinungen hinweisen.

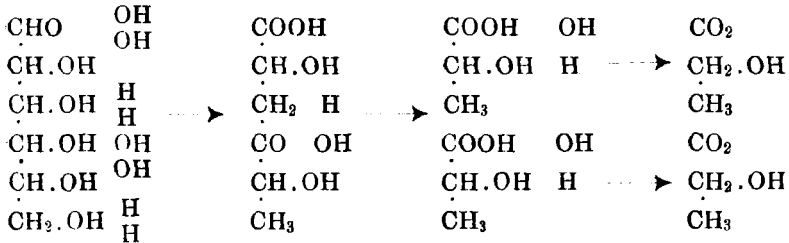
Nachdem »Accumulation des Sauerstoffs« stattgefunden hat, tritt nach von Baeyer Spaltung der Kohlenstoffkette ein, da, wo der Sauerstoff angehäuft ist; hierbei soll entweder das äussere Anhydrid der Aethylkohlenensäure oder das äussere Anhydrid der Milchsäure entstehen können, entsprechend einerseits der alkoholischen Gährung, andererseits der Milchsäuregährung. Bei der Formulirung dieser Vorgänge bevorzugt von Baeyer eine Art von symmetrischer Verschiebung der Hydroxylgruppen, wobei Reduction der Endglieder der Kohlenstoffkette, Oxydation der mittelständigen Kohlenstoffatome unter Bildung von mehreren Ketogruppen erfolgen soll. Zwischen Letzteren trete dann vermuthlich die Spaltung ein. Man kann übrigens diese Spaltung des Zuckers unter Beibehaltung des Hauptprincipes von v. Baeyer's Hypothese verschiedentlich formuliren, und uns scheint eine Annahme wahrscheinlicher zu sein, die zuerst Meisenheimer geäussert hat, dass nämlich der Zerfall der Kohlenstoffkette mit der Säurespaltung der Acetessigsäure Aehnlichkeit haben dürfte. Als Zwischenproduct würde dann eine Dioxy- γ -ketonsäure zu betrachten sein, wobei für das hypothetische Auftreten einer Ketogruppe gerade in der γ -Stellung die verhältnissmässige glatte Bildung von Lävulinsäure

¹⁾ Diese Berichte 3, 73 [1870].

²⁾ Diese Berichte 28, 3078 [1895].

³⁾ Diese Berichte 34, 1139 [1901].

beim Kochen von Fruchtzucker mit verdünnten Säuren als Analogon herangezogen werden könnte:



Glucose + Hypothetisches Zwischenproduct + H₂O 2 Mol. Milchsäure.

Diese Formulierung vermeidet die unwahrscheinliche Reduction der endständigen Aldehydgruppe, wie sie die ältere Erklärung verlangt. Bei γ -Ketonsäuren ist allerdings eine Säurespaltung nicht bekannt; aber im vorliegenden Falle handelt es sich um eine Dioxy- γ -Keton-säure, und die Anwesenheit von zwei Hydroxylgruppen kann auf die Beständigkeit des Moleküls von grösstem Einfluss sein. Es soll natürlich versucht werden, noch weitere Zwischenproducte des Zuckerzerfalles, ausser der Milchsäure, zu fassen.

Das intermediäre Auftreten des letzteren Körpers wird auch durch Beobachtungen von E. Duclaux¹⁾ gestützt. Nach diesem Forscher zerfällt Glucose im Sonnenlicht bei Gegenwart von Kalilauge unter Bildung von Alkohol und Kohlendioxyd, eine höchst interessante Beobachtung, die wir bei einem eigenen Versuch im letzten Sommer — es waren 2.6 pCt. vom Gewicht der Glucose an Alkohol gebildet worden — bestätigt fanden. Verwendet man aber an Stelle von Kaliumhydroxyd Baryt- oder Kalk-Wasser, so entstehen nach den Angaben von Duclaux aus dem Zucker ohne Alkoholbildung 50 pCt. Milchsäure²⁾. Für die Spaltung der Milchsäure dürfte demnach das stärkere Alkali nothwendig zu sein; Duclaux folgert weiter, dass bei der Zuckerspaltung im Sonnenlicht bei Gegenwart von allen Basen wahrscheinlich zuerst Milchsäure gebildet werde.

Es sei auch darauf hingewiesen, dass Duclaux bei obigen Versuchen aus Invertzucker inactive Milchsäure erthielt, wie wir bei der Gährung des Rohrzuckers durch Presssaft.

Die merkwürdigen Verschiedenheiten im Verhalten des Presssaftes, der bald das Verschwinden, bald die Bildung von Milchsäure bewirkt,

¹⁾ Annales de l'Institut National Agronomique 10 [1886]. Hr. Duclaux hatte die grosse Liebenswürdigkeit, uns einen Sonderabdruck aus dieser in Deutschland schwer zugänglichen Zeitschrift zur Verfügung zu stellen.

²⁾ Ann. de l'Institut Pasteur 7, 751 [1893]; 10, 168 [1896].

scheint uns am einfachsten durch die Annahme erklärt zu werden, dass es sich um die Wirkung zweier verschiedenen Enzyme handelt, von welchen das Eine den Zucker in Milchsäure spaltet, während das Andere die Zersetzung in Alkohol und Kohlendioxyd bewirkt. Sind beide Enzyme im Ueberschuss vorhanden oder werden beide stetig von neuem gebildet, so lassen sich nur die Endproducte der Zuckerspaltung fassen. Dieser Fall liegt bei der Gährung mit lebender Hefe vor, bei welcher übrigens auch noch Zwischenproducte durch die Ernährungsvorgänge verschwinden können. Ist dagegen die Neubildung der Enzyme ausgeschlossen, wie es für den zellfreien Presssaft zutrifft, so hängt es nur von dem physiologischen Zustand der angewandten Hefe ab, ob beide Enzyme in genügender Menge vorhanden sind. Dass der Enzymgehalt der Hefe je nach der Lebensperiode und den Ernährungsbedingungen wechselt, hat sich zum ersten Male bei den Untersuchungen über die Zymase ergeben¹⁾, und es ist nicht ausgeschlossen, dass der sogenannte physiologische Zustand überhaupt nichts anderes bedeutet als den jeweiligen Gehalt an Enzymen, bezw. die Fähigkeit zur Bildung von solchen²⁾. Wenn die Annahme von zwei verschiedenen Gährungsenzymen in der Bierhefe richtig ist, würde das Milchsäure bildende Enzym vielleicht dem analogen Agens der Milchsäurebacillen nahestehen; letztere Organismen würden aber im Gegensatz zur Bierhefe kein die Milchsäure spaltendes Enzym produciren können.

Die Ansicht, dass der Glucosezerfall bei der alkoholischen Gährung vielleicht nicht die Wirkung nur eines Enzymes sei, ist schon verschiedentlich geäußert worden³⁾. Auf Grund experimenteller Anhaltspunkte erfolgte die erste Andeutung darüber aber von unserer Seite gelegentlich des 5. internationalen Congresses für angewandte Chemie⁴⁾. Wir beabsichtigen, die Hypothese eingehend zu prüfen, unter anderem auch auf physikalisch-chemischem Wege, da, ihre Richtigkeit vorausgesetzt, der Vorgang der Zuckerspaltung bei der alkoholischen Gährung keine einfache monomolekulare Reaction wäre. Aus neuester Zeit liegen zwei Untersuchungen vor, die hier herangezogen werden könnten; da aber die eine, von J. H. Aberson⁵⁾, mit lebender Hefe ausgeführt ist, die andere, von R. O. Herzog⁶⁾, mit Aceton-Dauerhefe, halten wir es für nöthig, auch noch den Presssaft in Untersuchung zu ziehen.

¹⁾ E. Buchner, diese Berichte 31, 573 [1898].

²⁾ Vergl. M. Delbrück, Wochenschr. für Brauerei 20, 461 [1903].

³⁾ R. Neumeister, diese Berichte 30, 2964 [1897]; W. Pfeffer, Verhandl. der Ges. deutscher Naturforscher und Aerzte 1899. II. 1, 210.

⁴⁾ Chemiker-Zeitung, Cöthen, 27, 570 [1903].

⁵⁾ Rec. trav. chim. 22, 78 [1903].

⁶⁾ Zeitschr. für physiolog. Chem. 37, 149 [1902].

In Beziehung zu unserer Frage scheint noch die Annahme von Nencki zu stehen, dass bei der Verbrennung des Zuckers im Thierkörper Milchsäure als Zwischenproduct auftritt und den Diabetikern nur die Fähigkeit fehlt, den Traubenzucker in Milchsäure zu spalten⁵⁾.

Essigsäurebildung bei der zellfreien Gährung.

Zur Bestimmung der Essigsäure destillirten wir den Presssaft vor der Isolirung der Milchsäure, ohne anzusäuern, mit Wasserdampf bis zur neutralen Reaction. Es ist denkbar, dass sich geringe Mengen flüchtiger Säuren dem Nachweis in Folge Anwesenheit von Phosphaten entzogen haben. Wir glaubten aber auf Ansäuern mit Rücksicht auf die mögliche Zersetzung von Eiweissstoffen verzichten zu müssen.

Das Destillat wurde zur Trennung von gelöster Kohlensäure mit Baryumcarbonat gekocht, stark eingedampft, filtrirt, mit Phosphorsäure angesäuert und abermals mit Wasserdampf destillirt. Das Uebergegangene wurde titirt. In zwei Fällen wurde das Destillat mit Silbercarbonat gekocht, wobei geringe Silberausscheidung eintrat, vielleicht in Folge Anwesenheit von etwas Ameisensäure⁶⁾. Das in Lösung gegangene Salz zeigte die Eigenschaften des essigsauren Silbers und gab bei den Analysen um ein halbes Procent zu niedrige Silberzahlen; wahrscheinlich in Folge Anwesenheit höherer Fettsäuren, die sich schon bei der Wasserdampfdestillation in Form einer Trübung bemerkbar gemacht hatten und auf Verseifung irgend welcher Hefefette zurückzuführen sein dürften.

Der Essigsäuregehalt des frischen Saftes schwankte zwischen 0.004 und 0.010 pCt. Nach viertägigem Stehen bei 15—22° ohne Zuckerzusatz war derselbe auf 0.03—0.04, mit Zuckerzusatz aber auf 0.08—0.29 pCt. gestiegen. Es ist vielleicht zu erwähnen, dass die Hefepresssäfte, welche Milchsäure vergohren, übereinstimmend ziemlich viel Essigsäure lieferten, diejenigen, welche reichlich Milchsäure bildeten, dagegen viel weniger. Es soll vorläufig keine Ansicht, wie die Bildung der Essigsäure etwa zu erklären sei, geäußert werden.

Experimentelles.

Der aus Bierunterhefe in üblicher Weise hergestellte und sorgfältig durchgemischte Presssaft wurde unter Zusatz von 1 pCt. Toluol

⁵⁾ Vergl. M. Hahn, Nekrolog von Nencki, diese Berichte **35**, 4511 [1902].

⁶⁾ Die Bildung von Ameisensäure bei Gährung durch lebende Hefe unter besonderen Umständen wurde kürzlich von P. Thomas nachgewiesen. *Compt. rend.* **136**, 1015 [1903].

für die Versuche meist in Erlenmeyer-Kolben mit Schwefelsäuregährverschluss aufgestellt. Bezüglich des in einigen Fällen erfolgten Zusatzes von Milchsäure mag bemerkt sein, dass dabei Vorsicht nöthig ist, weil sonst im Presssaft Fällungen eintreten. Wir verwendeten eine dreiprocentige Lösung, und gaben sie tropfenweise unter fortwährendem Umschütteln zu. Nach Beendigung der Versuche wurde mit Wasserdampf so lange destillirt, bis die übergehenden Tropfen neutral reagirten. Das Destillat (2–8 L) wurde mit Baryumcarbonat neutralisirt und zur Vertreibung der Kohlensäure längere Zeit gekocht. Nach dem Abfiltriren des Ungelösten wurde stark eingedampft, mit Phosphorsäure angesäuert, die flüchtige Säure wiederum mit Wasserdampf übergetrieben und das Destillat mit $\frac{1}{2}$ -Natronlauge titrirt.

Nachdem der Rückstand der Wasserdampfdestillation durch ein Faltenfilter von den ausgeschiedenen Eiweissstoffen abfiltrirt, mit heissem Wasser nachgewaschen und das hellbraune Filtrat stark eingedampft worden war, wurde der hinterbleibende Syrup mit verdünnter Schwefelsäure und Wasser in einen Scheidetrichter gespült und wiederholt mit viel Aether ausgeschüttelt. Die dabei meist auftretende, sehr heftige Emulsion musste durch Zusatz von Alkohol beseitigt werden. In den ersten Versuchen, bei welchen je 800 ccm Saft zur Verwendung gelangten, wurde 14–15 Mal mit je 1– $1\frac{1}{2}$ L Aether durchgeschüttelt; dabei zeigte sich jedoch, dass die letzten Auszüge keine Milchsäure mehr enthielten; sechs- bis acht-maliges Durchschütteln genügte, um alle Milchsäure in den Aether zu bringen. Die vereinigten Aetherauszüge, mit entwässertem Natriumsulfat oberflächlich getrocknet und durch ein Faltenfilter gegossen, hinterliessen beim Abdestilliren einen bräunlichen Rückstand. Die durch Kochen mit Bleicarbonat hergestellte und filtrirte Lösung des Bleisalzes wurde durch Schwefelwasserstoff gefällt. Nach dem Verjagen des Schwefelwasserstoffs hinterblieb eine klare, schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit, welche siedend heiss mit Zinkcarbonat versetzt, vom Ueberschuss des Letzteren abfiltrirt und auf dem Wasserbade stark eingeengt wurde. Die Krystallisation des Zinksalzes beförderte man durch Zugabe von Alkohol, wobei jedoch grosse Vorsicht nöthig ist, da sonst das Zinklactat amorph ausfällt und ausserdem andere Substanzen mitgerissen werden. Nach beendeter Abscheidung wurde das Salz abgesaugt und mit schwach verdünntem Alkohol ausgewaschen. Die Mutterlauge, nochmals in ähnlicher Weise behandelt, lieferte aber nur in wenigen Fällen noch geringe Mengen des Salzes, die mit der ersten Krystallisation vereinigt wurden. Das so gewonnene Zinklactat bildete ein weisses bis gelblich-weisses Pulver oder Nadeln; die unten gegebenen Zahlen sind auf dieses Product berechnet.

Milchsäure und Essigsäure bei der Gärung mit Hefepresssaft.

Nummer des Versuches	Datum	Press- saft	Ver- suchs- dauer	Zusatz von		Nach dem Versuche gefunden					
				Rohr- zucker	Milch- säure	Milchsäure			Essigsäure		
						g	g	g	pCt.	Zu- nahme ¹⁾	g
ccm	Tage	g	g	g	pCt.	pCt.	g	pCt.	pCt.		
I.	2. 5. 03	800	0	—	—	1.5	0.19	—	Spur	0	—
		800	4	—	—	0	0	— 0.19	0.31	0.04	0.04
		800	4	80	—	1.5	0.19	0	1.53	0.19	0.19
II.	22. 7. 03	800	0	—	—	0	0	—	0.05	0.01	—
		800	4	—	—	0	0	0	0.34	0.04	0.03
		800	4	80	—	0	0	0	2.30	0.29	0.28
III.	7. 10. 03	800	0	—	—	0.84	0.11	—	0.03	0.00	—
		800	4	—	—	0	0	— 0.11	0.24	0.03	0.03
		800	4	80	—	1.80	0.23	+ 0.12	2.28	0.29	0.29
IV.	21. 10. 03	500	0	—	—	Spur	0	—	nicht geprüft		
		500	6	—	1.5	0	0	— 0.30	»	»	»
V.	4. 11. 03	300	0	—	—	0.24	0.08	—	»	»	»
		300	4	—	0.99	1.20	0.40	— 0.01	»	»	»
		300	4	—	0.99 ²⁾	0.99	0.33	— 0.08	»	»	»
VI.	26. 11. 03	200	0	—	—	0	0	—	»	»	»
		250	4	—	0.73	0.72	0.29	0	»	»	»
VII.	5. 12. 03	200	0	—	—	0.05	0.03	—	»	»	»
		200	4	—	—	0.85	0.43	+ 0.40	»	»	»
		200	4	—	0.31	0.96	0.48	+ 0.30	»	»	»
		200	4	—	0.61	1.18	0.59	+ 0.26	»	»	»
VIII.	16. 12. 03	200	0	—	—	0	0	—	»	»	»
		200	4	—	0.3	0.57	0.29	+ 0.14	»	»	»
		200	4	—	0.6	0.85	0.43	+ 0.13	»	»	»
		200	4	20	—	0.34	0.17	+ 0.17	»	»	»
IX.	6. 1. 04	250	0	—	—	0.34	0.14	—	0.02	0.01	—
		250	4	—	—	0.91	0.36	+ 0.23	0.11	0.04	0.03
		250	4 ^{1/2}	—	0.38	0.98	0.40	+ 0.11	0.12	0.05	0.04
		250	5	—	0.75	1.33	0.53	+ 0.09	0.10	0.04	0.03
		250	5 ^{1/2}	25	—	0.63	0.25	+ 0.11	0.21	0.08	0.07
X.	15. 1. 04	250	0	—	—	0.30	0.12	—	nicht geprüft		
		250	4	—	0.38	1.07	0.43	0.16	»	»	»

I. (2.5.03): 1) 800 ccm Presssaft, sofort verarbeitet, enthielten Spuren von Essigsäure und 1.5 g Milchsäure. 2) 800 ccm Saft, 8 ccm Toluol, 4 Tage bei Zimmertemperatur, Watteverschluss. Gef. Essigsäure 0.31 g, Milchsäure keine. 3) 800 ccm Saft, 80 g Rohrzucker, 8 ccm Toluol, 4 Tage bei Zimmertemperatur, Watteverschluss. Gef. Essigsäure 1.53 g, Milchsäure 1.5 g.

¹⁾ bzw. Abnahme.

²⁾ Nach Beendigung des Versuches zugesetzt (Controllversuch).

Die in 3) gewonnene flüchtige Säure wurde in das Silbersalz übergeführt und Letzteres durch zweimaliges Krystallisiren aus Wasser gereinigt. Farblose Nadeln.

0.1914 g Sbst.: 0.1228 g Ag.

$C_2H_3O_2Ag$. Ber. Ag 64.7. Gef. Ag 64.2.

Die aus den Versuchen 1) und 3) isolirten Zinksalze wurden vereinigt und zwei Mal aus Wasser umkrystallisirt. Schön ausgebildete, farblose Nadeln. Das lufttrockne Salz gab bei der Analyse folgende Zahlen:

0.3608 g Sbst.: 0.1008 g ZnO.

$(C_3H_5O_3)_2Zn + 3H_2O$. Ber. Zn 22.0. Gef. Zn 22.4.

II. (22. 7. 03): 1) 800 ccm Saft, frisch verarbeitet, ergaben 0.05 g Essigsäure und keine Milchsäure. 2) 800 ccm Saft, 8 ccm Toluol, 4 Tage bei Zimmertemperatur, Watteverschluss. Gef. 0.34 g Essigsäure, keine Milchsäure. 3) 800 ccm Saft, 80 g Rohrzucker, 8 ccm Toluol, 4 Tage bei Zimmertemperatur, Watteverschluss. Gef. 2.30 g Essigsäure, keine Milchsäure.

III. (7. 10. 03): 1) 800 ccm Saft, frisch verarbeitet, ergaben 0.03 g Essigsäure und 0.84 g Milchsäure. Beim Eindampfen der Zinklactatlösung schied sich merkwürdiger Weise eine beträchtliche Menge von in Wasser ganz unlöslichem Zinkphosphat (Molybdänsäurereaction) aus (vergl. auch IV, 1). Das Auftreten dieses Salzes dürfte wohl so zu erklären sein, dass dem eingedampften Saft durch den Aether eine organische Phosphorsäureverbindung entzogen wird, welche ein lösliches Blei- und Zink-Salz bildet, bei längerem Kochen mit Wasser aber unter Abspaltung von Phosphorsäure zerfällt. 2) 800 ccm Saft, 8 ccm Toluol, 4 Tage bei 22°. In diesem und allen folgenden Versuchen war der Kolben durch ein Schwefelsäuregährventil verschlossen. Gef. 0.24 g Essigsäure und keine Milchsäure. 3) 800 ccm Presssaft, 80 g Rohrzucker, 8 ccm Toluol, 4 Tage bei 22°. Gef. 2.28 g Essigsäure, 1.8 g Milchsäure.

Die Essigsäure wurde durch Kochen mit Silbercarbonat, wobei geringe Silberreduction eintrat, in das Silbersalz übergeführt; es wurden so 5.83 g ein Mal aus Wasser krystallisirtes Salz erhalten (ber. auf 2.28 g : 6.29 g). Dasselbe wurde durch nochmalige Krystallisation gereinigt und ergab alsdann bei der Analyse folgende Zahlen:

0.1908 g Sbst.: 0.1223 g Ag.

$C_2H_3O_2Ag$. Ber. Ag 64.7. Gef. Ag 64.1.

Das aus 1) und 3) isolirte Zinklactat wurde gleichfalls durch Umkrystallisiren aus Wasser gereinigt und dann in prachtvollen, farblosen Nadeln erhalten.

0.1816 g Sbst.: 0.0498 g ZnO.

$(C_3H_5O_3)_2Zn + 3H_2O$. Ber. Zn 22.0. Gef. Zn 22.0.

Die wässrige Lösung des Salzes drehte, im Polarimeter untersucht, die Ebene des polarisirten Lichtes nicht.

IV. (21. 10. 03): 1) 500 ccm Saft, frisch verarbeitet, ergaben nur Spuren von Milchsäure. Dagegen schieden sich beim Eindampfen der Zinksalzlösung reichliche Mengen von Zinkphosphat aus (vergl. III, 1). 2) 500 ccm Saft, 50 ccm 3-proc. Milchsäurelösung (enthaltend 1.5 g Milchsäure), 5 ccm Toluol, 6 Tage bei 22°. Gef. keine Milchsäure.

V. (4. 11. 03): 1) 300 ccm Saft, frisch verarbeitet, enthielten 0.24 g Milchsäure. 2) 300 ccm Saft, 30 ccm 3.3-proc. Milchsäurelösung (= 0.99 g Säure), 4 Tage bei 22°, 3 ccm Toluol. Gef. 1.20 g Milchsäure. 3) 300 ccm Saft, 3 ccm Toluol, 4 Tage bei 22°. Alsdann mit 30 ccm 3.3-proc. Milchsäurelösung (= 0.99 g Säure) versetzt (zur Controlle). Gef. 0.99 g Milchsäure.

VI. (26. 11. 03): 1) 200 ccm Saft, frisch verarbeitet, enthielten keine Milchsäure. 2) 250 ccm Saft, 2.5 ccm Toluol, 25 ccm 2.9-procentige Milchsäurelösung (= 0.73 g Säure), 4 Tage bei 22°. Gef. 0.72 g Milchsäure.

VII. (5. 12. 03): Bei dieser, sowie allen folgenden Versuchsreihen wurden die Gährkraft des frischen Saftes, sowie die Selbstgährung bestimmt. 20 ccm Saft lieferten mit 8 g Rohrzucker und 0.2 ccm Toluol in 4 Tagen bei 22° im Durchschnitt von 2 Versuchen 1.97 g CO₂; 50 ccm Saft mit 0.5 ccm Toluol ohne Zuckerzusatz in 4 Tagen bei 22°: 0.47 g CO₂ (im Durchschnitt von 2 Versuchen). 1) 200 ccm Saft, frisch verarbeitet, enthielten 0.05 g Milchsäure. 2) 200 ccm Saft, 2 ccm Toluol, 4 Tage bei 22°. Gef. 0.85 g Milchsäure. 3) 200 ccm Saft, 2 ccm Toluol, 10 ccm 3.06-procentige Milchsäurelösung (= 0.31 g Säure), 4 Tage bei 22°. Gef. 0.96 g Milchsäure. 4) 200 ccm Saft, 20 ccm 3-procentige Milchsäurelösung (= 0.61 g Säure), 2 ccm Toluol, 4 Tage bei 22°. Gef. 1.18 g Milchsäure.

VIII. (16. 12. 03): Gährkraft (20 ccm): 1.56 g CO₂; Selbstgährung (50 ccm): 0.10 g CO₂. 1) 200 ccm Saft, frisch verarbeitet, ergaben keine Milchsäure. (Dieser Versuch wurde zwei Mal mit dem gleichen Resultate durchgeführt). 2) 200 ccm Saft, 10 ccm 3-procentige Milchsäurelösung (= 0.3 g Milchsäure), 2 ccm Toluol, 4 Tage bei 22°. Gef. 0.57 g Milchsäure. 3) 200 ccm Saft, 20 ccm 3-procentige Milchsäurelösung (= 0.6 g Säure), 2 ccm Toluol, 4 Tage bei 22°. Gef. 0.85 g Milchsäure. 4) 200 ccm Saft, 20 g Rohrzucker, 2 ccm Toluol, 4 Tage bei 22°. Gef. 0.34 g Milchsäure.

IX. (6. 1. 04): Gährkraft (20 ccm): 1.70 g CO₂; Selbstgährung (50 ccm): 0.15 g CO₂. 1) 250 ccm Saft, frisch verarbeitet, enthielten 0.02 g Essigsäure und 0.34 g Milchsäure. 2) 250 ccm Saft, 2.5 ccm Toluol, 4 Tage bei 22°. Gef. 0.11 g Essigsäure und 0.91 g Milchsäure. 3) 250 ccm Saft, 2.5 ccm Toluol, 12.5 ccm 3-procentige Milchsäurelösung (= 0.375 g Säure), 4½ Tage bei 22°. Gef. 0.12 g Essigsäure, 0.98 g Milchsäure. 4) 250 ccm Saft, 2.5 ccm Toluol, 25 ccm 3-procentige Milchsäurelösung (= 0.75 g Säure), 5 Tage bei 22°. Gef. 0.10 g Essigsäure, 1.33 g Milchsäure. 5) 250 ccm Saft, 2.5 ccm Toluol, 25 g Rohrzucker, 5½ Tage bei 22°. Gef. 0.21 g Essigsäure, 0.63 g Milchsäure.

X. (15. 1. 04): Gährkraft (20 ccm): 2.31 g CO₂; Selbstgährung (50 ccm): 0.26 g CO₂. Die Versuche wurden mit Presssaft aus Münchener Unterhefe angestellt. 1) 250 ccm Saft, frisch verarbeitet, enthielten 0.3 g Milchsäure. 2) 250 ccm Saft, 2.5 ccm Toluol, 12.5 ccm 3-procentiger Milchsäurelösung (= 0.375 g Säure), 4 Tage bei 22°. Gef. 1.07 g Milchsäure.