

Allgemeine Reaktionswärme des Azofarbstoff-Bildungsprozesses, berechnet für festes *p*-Nitroanilin und β -Naphthol und gelöste HNO_2 :

Lösungswärme des <i>p</i> -Nitroanilins in CH_3COOH	— 4.47 Cal.
Diazotierung in Essigsäure	+ 18.42 »
Kupplungsprozeß	+ 26.21 »
	+ 40.16 Cal.

Diese Größe weicht stark von der entsprechenden Reaktionswärme anderer Azofarbstoff-Bildungen ab, da aber *p*-Nitrodiazobenzol auch in anderer Hinsicht vereinzelt dasteht, müssen wir mit der Erklärung dieser Abweichung auf neue Untersuchungen warten.

Kiew, April 1910, Polytechnikum.

278. Eduard Buchner und Jakob Meisenheimer: Die chemischen Vorgänge bei der alkoholischen Gärung.

[IV. Mitteilung.]

[Aus dem Chem. Laboratorium der Landwirtschaftl. Hochschule zu Berlin.]

(Eingegangen am 27. Mai 1910.)

1. Rolle der Milchsäure.

Bei zellfreier Gärung des Zuckers war mehrfach die Bildung von Milchsäure festgestellt worden (siehe die früheren Mitteilungen¹⁾); in anderen Fällen verschwand dagegen sogar zugesetzte Milchsäure. Die Ursache, warum bei der Gärung durch Hefepreßsaft bald Zu-, bald Abnahme der Milchsäure stattfindet, konnte nicht aufgeklärt werden. Es scheint, daß der physiologische Zustand der verwendeten Hefe die Ursache vorstellt. Auch ein Zusammenhang zwischen vergorener Zuckermenge und verschwundener bzw. gebildeter Milchsäure ließ sich nicht feststellen. Insbesondere gelang es nicht, nachzuweisen, daß die nach beendeter Gärung nicht mehr auffindbare Milchsäure wirklich vergoren, d. h. in Alkohol und Kohlendioxyd umgewandelt worden war. Trotzdem ist es am wahrscheinlichsten, daß die bei der zellfreien Gärung auftretende Milchsäure dem Zucker entstammt und nicht etwa in einem der Fuselöl-²⁾ oder der Bernsteinsäure-Bildung³⁾ vergleichbaren Prozeß aus Abbauprodukten von Eiweißstoffen, z. B. aus Alanin oder Asparagin, entsteht; denn die Enzyme, welche jene

¹⁾ Diese Berichte **37**, 417 [1904]; **38**, 620 [1905]; **39**, 3201 [1906].

²⁾ F. Ehrlich, Biochem. Ztschr. **1**, 8 [1906]. Diese Berichte **40**, 1027 [1907].

³⁾ F. Ehrlich, Biochem. Ztschr. **18**, 391 [1909].

Vorgänge vermitteln, haben sich bisher im Preßsaft nicht nachweisen lassen¹⁾.

Eine endgültige Entscheidung darüber, ob die Milchsäure als Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung betrachtet werden dürfe, mit Hilfe der zellfreien Gärung herbeizuführen, ist demnach nicht gelungen. Wir haben sie daraufhin auf anderem Wege gesucht. Im allgemeinen wird man erwarten, daß ein Zwischenprodukt des Zuckerzerfalles gelegentlich einmal bei der alkoholischen Gärung mit lebender Hefe aufzufinden sein und unter Umständen auch selbst durch lebende Hefe vergoren werden sollte²⁾. Wie schon Pasteur zeigte, ist unter den Gärprodukten niemals Milchsäure anzutreffen, wenn nicht der Gärung durch reine Hefe zufällig eine solche durch Bakterien beigegeben ist, eine Tatsache, die auch durch unsere Versuche bestätigt wird.

Dagegen fehlen bis jetzt ausführliche Feststellungen über das Verhalten der Milchsäure gegenüber lebender Hefe. Im Folgenden sind eine große Zahl von solchen beschrieben, bei welchen wir uns insbesondere nicht damit begnügt haben, das etwaige Verschwinden der Milchsäure nachzuweisen, sondern auch auf die allenfallsigen Gärprodukte, Alkohol und Kohlensäure, gefahndet haben. Um mit völliger Reinkultur einer Heferasse und gesichert vor Gasverlusten arbeiten zu können, wurde ein besonderer Gärapparat³⁾ benutzt, der ausschließlich durch Glasschliffe mit Quecksilberschlüssen gedichtet war. Die bei den quantitativen Versuchen durch das Vorkommen von Glykogen im Aussaatmaterial sowie in der Hefe am Schlusse der Versuche entstehenden Fehlerquellen ließen sich durch langes Stehen der herangewachsenen Aussaat unter Wasser, sowie durch Verlängerung der Versuchsdauer erfolgreich bekämpfen. Ein Wachstum der Hefe während der Versuche war durch Verwendung einer stickstofffreien Gärlösung, bestehend lediglich aus Zucker und Leitungswasser, ausgeschlossen.

Die Bestimmung der Milchsäure machte große Schwierigkeiten. Nach mehreren mißglückten Versuchen erwies es sich als unumgänglich nötig, zunächst die Milchsäure durch erschöpfendes Ausäthern abzutrennen, worauf wir anfangs verzichten zu können glaubten, und sie dann erst zur Wägung in das Zinksalz überzuführen. Zur

¹⁾ Diese Berichte **39**, 3208 [1906].

²⁾ Eine theoretische Notwendigkeit stellt allerdings ein derartiges Verhalten nicht vor, worauf A. Wohl, *Biochem. Ztschr.* **5**, 59 [1907], hingewiesen hat; vgl. dazu auch J. Tafel, diese Berichte **40**, 2318 [1907], sowie Buchner und Meisenheimer, *Thiels Landwirtschaftl. Jahrbücher* **38**, Ergänz.-Bd. **5**, 272 [1909].

³⁾ Der Apparat ist in *Thiels Landwirtschaftl. Jahrb.* **38**, Ergänz.-Bd. **5**, 278 [1909] ausführlich beschrieben und abgebildet.

Extraktion bedienten wir uns dabei des Apparates von G. Schacherl mit der Abänderung von C. von der Heide¹⁾, der bei jeder Bestimmung mindestens 50 Stunden lang in Gang blieb.

Eine größere Anzahl von ausführlichen Versuchsreihen²⁾ zeigten nun, daß die Milchsäure nicht vergoren wird; 3 besonders gut gelungene, bei welchen wir uns in Kontrollversuchen von der Zuverlässigkeit der Milchsäure-Bestimmung überzeugten und bei denen zum Teil Zucker zugesetzt wurde, um die Wahrscheinlichkeit der Zerlegung der Milchsäure zu erhöhen, sind im experimentellen Teil in Tabelle 1 unter Nr. I—III aufgeführt.

Dem Einwand, daß zu unseren Versuchen vielleicht nicht die richtige Heferasse verwendet worden sei, darf kaum großes Gewicht beigelegt werden; die von uns benützte Heferasse 792 ist eine viel verwendete, typische untergärige Brauereihefe³⁾, für deren Überlassung wir dem Institut für Gärungsgewerbe zu Berlin (Hrn. Geheimrat M. Delbrück) zu Dank verpflichtet sind. Sollte sich tatsächlich irgend eine andere Hefe anders gegen Milchsäure verhalten, so müßte man wohl eher diesen Fall als einen anormalen betrachten. Schwerer wiegt dagegen unseres Erachtens ein darauf gestütztes Bedenken, daß die für die Hefe schädliche Milchsäure nur langsam in das Innere der Hefezellen hinein diffundiert, und daß gerade hierin ein Unterschied zwischen Preßsaft und der Hefe gegenüber Milchsäure begründet ist. Um auch diese Möglichkeit auszuschließen, wurden 4 Versuchsreihen unter Anwendung von milchsauren Salzen angesetzt, die in Tabelle 1 unter Nr. IV—VII wiedergegeben sind. Bei den beiden ersten derselben, in Pasteur-Kolben ausgeführt, zeigte sich tatsächlich der erwartete Erfolg: die Milchsäure verschwand, und zwar um so mehr, je länger die Versuche dauerten. Daraufhin wurde in Versuchsreihe VI nicht nur auf Milchsäure geprüft, sondern auch die Bildung von Alkohol und Kohlendioxyd quantitativ verfolgt, wozu sich die Benützung des oben erwähnten Gärapparates als notwendig erwies. Nun war überraschenderweise nur ganz wenig Milchsäure verschwunden und dementsprechend auch keine Alkohol- und Kohlensäure-Produktion eingetreten. Wir suchten die Ursache des Unterschiedes zwischen den beiden ersten Versuchsreihen in Pasteur-Kolben und dem dritten im Gärapparat in dem mangelnden Luftzutritt bei Verwendung des letz-

¹⁾ Bericht der K. Lehranstalt für Weinbau in Geisenheim a. Rh. für 1906, 253.

²⁾ Genaue Angaben darüber siehe Thiel's Landwirtschaftl. Jahrb. 38, Ergänz.-Bd. 5, 278 [1909]

³⁾ F. Schönfeld u. W. Rommel, Wochenschr. f. Brauerei 23, 523 [1906].

teren. In der Tat gingen bei den Versuchen der letzten Reihe VII, bei welchen Milchsäure im Gärapparat mit lebender Hefe unter mehrmaligem Luftzuleiten behandelt wurde, die Kohlendioxyd-Zahlen wieder erheblich in die Höhe, und auch die Milchsäure verschwand in etwas erhöhtem Umfange. Die Menge des Alkohols war geringer, da derselbe offenbar zu Assimilationsvorgängen aufgebraucht worden war. Daß die Abnahme der Milchsäure hier nicht den gleichen Umfang wie in den beiden Versuchsreihen IV und V erreichte, ist vielleicht auf eine Abschwächung der angewandten Hefe, verursacht durch das hier nötig gewordene andauernde Waschen mit sterilem Wasser behufs Entfernung des Glykogens, zurückzuführen.

Alle diese Versuche stimmen somit darin überein, daß Milchsäure von lebender Hefe weder vergoren, noch gebildet wird. Zu denselben Ergebnissen ist in den letzten Jahren auch A. Slator¹⁾ gekommen, welcher den Einfluß von Milchsäure-Zusätzen auf die Geschwindigkeit von Zucker-Gärungen durch den Druck der entwickelten Kohlensäure innerhalb sehr kleiner Zeiträume zur Messung brachte. Die Beweiskraft unserer ausführlichen Untersuchungen, die allein zu einer wirklichen Isolierung der unveränderten Milchsäure führten, ist jedoch eine erheblich größere.

Nach diesen Ergebnissen scheint die Annahme von Milchsäure als Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung nicht mehr genügend begründet.

Dazu kommt noch ein weiteres Moment, das in der Größe der Verbrennungswärmen dieser Verbindungen liegt. Die Differenz zwischen den Wärmewerten von Zucker und Milchsäure einerseits, bzw. von Zucker, dann Alkohol und Kohlensäure andererseits ist derart, daß sich der Übergang von Milchsäure in Alkohol und Kohlensäure unter geringer Wärmeaufnahme vollziehen müßte, d. h. die ganze, beim Zerfall des Zuckers auftretende Wärmemenge, und sogar noch etwas mehr, wird schon frei, wenn der Zucker in Milchsäure übergeht²⁾. Auch diese Tatsache spricht nicht zugunsten der Annahme des letzteren Körpers als Zwischenprodukt.

2. Mögliche Vorstufen der Milchsäure.

Sieht man aus den eben entwickelten Gründen von der Annahme von Milchsäure als Zwischenprodukt ab, so kommen als solches zu-

¹⁾ Journ. Chem. Soc. **89**, 141 [1906], **93**, 231 [1908]; diese Berichte **40**, 123 [1907].

²⁾ Vgl. auch A. Wohl, Biochem. Ztschr. **5**, 61 [1907].

nächst einige Vorstufen der Milchsäure in Betracht¹⁾, d. h. Stoffe mit ebenfalls dreigliedriger Kohlenstoffkette, deren Entstehung aus dem Traubenzucker-Molekül theoretisch leicht zu erklären ist, und die ferner auf einfachem Wege in Milchsäure umgelagert werden können. Trifft diese letzte Bedingung zu, so würde das von uns beobachtete Auftreten von Milchsäure in geringen Mengen bei der zellfreien Gärung verständlich sein.

Als solche Vorstufen sind zu betrachten: Methyl-glyoxal, das in alkalischer Lösung wahrscheinlich leicht in Milchsäure übergeht²⁾, dann Glycerinaldehyd, der einerseits in alkalischer Lösung in Dioxyceton³⁾, andererseits, wie J. Meisenheimer demnächst berichten wird, durch Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure in Methylglyoxal übergeführt werden kann, und endlich Dioxyceton, das sich in alkalischer Lösung in Glycerinaldehyd³⁾ und beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure in Methylglyoxal⁴⁾ umlagert. Zur Prüfung der Frage, ob einer dieser Körper als Zwischenprodukt zu betrachten sei⁵⁾, konnte entweder, soweit möglich, der direkte Nachweis des Auftretens bei der alkoholischen Gärung, oder die Vergärbarkeit durch lebende Hefe oder durch Hefepreßsaft herangezogen werden. Eine Klärung haben wir erst durch Darstellung der drei Körper in reinem Zustande und Vergleich ihrer Eigenschaften neben einander erreicht.

Methyl-glyoxal.

Über das Verhalten dieses Körpers gegenüber lebender Hefe liegen Versuche mit negativem Ergebnis von P. Mayer⁶⁾ und von A. Wohl⁷⁾, und gegenüber Hefepreßsaft von uns⁸⁾ vor. Es tauchten aber Zweifel an der völligen Reinheit des damals nach der schwierigen Ozon-Methode von C. Harries und H. Türk⁹⁾ dargestellten Präparates auf. Sofort nach Bekanntwerden bedienten wir uns deshalb des neuen

¹⁾ Die von R. Kusscrow (Zentralbl. f. Bakt. II, **26**, 184 [1910]) aufgestellten Hypothesen über den Verlauf des Zucker-Zerfalles stehen mit der Erfahrung in keinem Zusammenhang und wurden bereits von E. von Lippmann (Chem.-Ztg. **34**, 177 [1910]) mit Recht zurückgewiesen.

²⁾ A. Wohl, Biochem. Ztschr. **5**, 56 [1907].

³⁾ A. Wohl, diese Berichte **33**, 3099 [1900].

⁴⁾ G. Pinkus, diese Berichte **31**, **32**, 36 [1898].

⁵⁾ Diese drei Stoffe sind leicht oxydierbar und könnten bei der gewöhnlichen Sauerstoffatmung der Pflanzen im Sinne S. Kostytschews (Biochem. Ztschr. **23**, 137 [1909]) ohne Schwierigkeit weiter verarbeitet werden.

⁶⁾ Biochem. Ztschr. **2**, 435 [1907]. ⁷⁾ Biochem. Ztschr. **5**, 59 [1907].

⁸⁾ Diese Berichte **39**, 3202 [1906]. ⁹⁾ Diese Berichte **38**, 1630 [1905].

ausgezeichneten Weges von A. Wohl und M. Lange¹⁾ zur Darstellung des Methylglyoxal-Acetal, welches nach Versuchen von J. Meisenheimer durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure glatt in Methylglyoxal übergeführt werden kann. Hefepreßsaft geriet nun auf Zusatz von Methylglyoxal (es wurden 1.4% hinzugegeben) nicht in Gärung; im Gegenteil wurde die Selbstgärung des Preßsaftes erheblich vermindert. Die Lösung färbte sich bald tief gelb, dann erschien ein gelbbrauner Niederschlag, und schließlich trat völlige Gerinnung ein, also eine chemische Reaktion, die wohl auf die Einwirkung der Aldehydgruppe auf die Eiweißkörper des Preßsaftes zurückzuführen ist. Ähnlich negativ verlief der Versuch bei Anwendung lebender Hefe. In allen Fällen war nach der volumetrischen Methode geprüft worden, nämlich durch Absperren der Versuchsflüssigkeiten im Eudiometerrohr über Quecksilber, ein Verfahren, welches außerordentlich empfindlich ist, so daß nach seinem negativen Ausfall auf gewichtsanalytische Versuche verzichtet werden konnte.

Infolge der Flüchtigkeit des Methylglyoxals mit Wasserdampf war noch eine Möglichkeit geboten, direkt auf das Auftreten dieses Körpers während des Gärungsverlaufes zu prüfen. Eine Preßsaft-Gärung wurde unter stark vermindertem Druck bei 20—30° in Gang gesetzt, der übergelende Wasserdampf verdichtet und gleichzeitig Wasser nachfließen gelassen. Das Destillat ergab beim Eindampfen mit Semicarbazid aber nicht das wohlbekannte Semicarbazon des Methylglyoxals; es konnte nur die Bildung von etwas Hydrazodicarbonamid²⁾ nachgewiesen werden. Nach diesen Versuchen dürfte das Methylglyoxal aus der Reihe der möglichen Zwischenprodukte ausscheiden.

Glycerinaldehyd.

Mit dem Rohprodukt, das bei der Oxydation des Glycerins entsteht, und außer Glycerinaldehyd auch Dioxyceton enthält, der sogenannten Glycerose, sind Gärversuche von J. van Deeu³⁾, Grimaux⁴⁾ und von Emil Fischer und J. Tafel⁵⁾ mit positivem Erfolge angestellt worden; auf dieses Gemenge kommen wir in dem Abschnitt über Dioxyceton nochmals zu sprechen. Versuche über die Gär-

¹⁾ Diese Berichte **41**, 3612 [1908].

²⁾ J. Thiele und O. Stange, Ann. d. Chem. **283**, 21 [1894].

³⁾ Jahresberichte für Chemie **1863**, 501; zitiert nach E. Fischer, diese Berichte **23**, 2124 [1890].

⁴⁾ Compt. rend. **104**, 1277 [1887].

⁵⁾ Diese Berichte **22**, 110 [1889]; vgl. auch E. Fischer, Untersuchungen über Kohlenhydrate und Fermente, Vorwort IV.

fähigkeit des reinen Glycerinaldehyds liegen vor von A. Wohl¹⁾ und von O. Emmerling²⁾, welche beide eine Vergärung nicht erzielen konnten. Wir haben eine große Anzahl von Experimenten mit Material ausgeführt, welches nach der schönen Methode von A. Wohl³⁾ hergestellt wurde. Zunächst erwies sich das Diäthylacetal des Körpers durch Preßsaft nicht vergärbar, da eine Verseifung des Acetals nachweislich nicht eintrat. Dagegen ergaben sämtliche mit Glycerinaldehyd selbst angestellten Versuche, daß derselbe sowohl durch Hefepreßsaft wie durch lebende Hefe zwar langsam und durchaus nicht vollständig, aber doch in sehr deutlich nachweisbarem Maße (etwa 10—25 %) vergärbar ist. Es liegen sowohl volumetrische als gewichtsanalytische Versuche vor. Bei letzteren wurde die Bildung von Kohlensäure und von Alkohol quantitativ verfolgt. Setzt man zu Hefepreßsaft Glycerinaldehyd bis zu 1 % der Lösung, so tritt bereits in einigen Stunden Braunfärbung der Flüssigkeit und schließlich auch Ausscheidung eines Niederschlags ein — Veränderungen, die erklären, daß die Gärungsvorgänge allmählich zum Stillstand kommen und keinen so großen Umfang erreichen, wie in 1-prozentiger Traubenzuckerlösung.

Vergebliche Versuche, Glycerinaldehyd in Gärungsflüssigkeiten mittels der Phloroglucin-Reaktion direkt nachzuweisen, hat W. Löb⁴⁾ veröffentlicht.

Dioxy-aceton.

Während nach älteren Versuchen von Grimaux⁵⁾ und neueren von G. Bertrand⁶⁾ das Dioxyaceton durch Bierhefe vergärbar sein soll, kamen sowohl O. Piloty⁷⁾, wie O. Emmerling⁸⁾ zu dem entgegengesetzten Resultat. Nachdem jene Verbindung durch die vorzügliche Methode von G. Bertrand⁹⁾ nunmehr in reinem Zustande leicht zugänglich geworden ist, haben wir ihre Gärfähigkeit eingehend geprüft. Dioxyaceton wird in 2-prozentiger Lösung von

¹⁾ Diese Berichte **31**, 1800 [1898]; A. Wohl und C. Neuberg, diese Berichte **33**, 3098 [1900].

²⁾ Diese Berichte **32**, 543 [1899].

³⁾ Diese Berichte **31**, 1796, 2394 [1898]; A. Wohl und C. Neuberg, diese Berichte **33**, 3095 [1900].

⁴⁾ Ztschr. für Elektrochemie **13**, 511 [1907].

⁵⁾ Compt. rend. **104**, 1277 [1887].

⁶⁾ Ann. chim. phys. [8] **3**, 256 [1904].

⁷⁾ Diese Berichte **30**, 3166 [1897].

⁸⁾ Diese Berichte **32**, 543 [1899].

⁹⁾ Ann. chim. phys. [8] **3**, 181 [1904]. Wir sind Hrn. G. Bertrand für Überlassung einer Reinkultur der Sorbose-Bakterien zu großem Danke verpflichtet.

konzentriertem Preßsaft bei Zusatz von Kochsaft¹⁾ unter Kohlendioxyd- und Alkohol-Bildung deutlich vergoren, ohne daß, wie beim Glycerinaldehyd, schon nach kurzer Zeit Trübung und Dunkelfärbung des Saftes eintritt. In 5 Tagen bildet sich dabei ebensoviel Kohlendioxyd wie mit 2-prozentiger Glucoselösung. Eine 5- und eine 10-prozentige Dioxyacetonlösung liefern nicht mehr Kohlendioxyd, offenbar wegen Schädlichkeit des Dioxyacetons, die nach einigen Tagen in Braunfärbung und Niederschlagsbildung hervortritt. Es ist wahrscheinlich, daß diese Erscheinungen auf den allmählichen Übergang von Dioxyaceton in Glycerinaldehyd zurückzuführen sind, welcher im Preßsaft die erwähnten Vorgänge, wie oben schon berichtet, erzeugt; direkt nachzuweisen war allerdings Glycerinaldehyd in den vergorenen Dioxyacetonlösungen nicht. Nach der Menge des Kohlendioxyds und Alkohols zu schließen, gelang es 80–90 % des Dioxyacetons zu vergären, allerdings nur dann, wenn mit einem Gemenge von Preßsaft und Kochsaft gearbeitet wurde; letzterer enthält den als Ko-Enzym bezeichneten Hilfsstoff, welcher merkwürdigerweise die Vergärung kleiner Mengen von Dioxyaceton viel stärker begünstigt, als die entsprechender Mengen Traubenzucker. Daß die Gärung viel langsamer einsetzt als bei Traubenzucker, beruht nachweislich nicht darauf, daß die Auflösung des Dioxyacetons in Wasser zunächst ähnlich wie es für Glycerinaldehyd nachgewiesen ist²⁾, in bimolekularer Form³⁾ erfolgt; denn auch erhitzte, ohne Zweifel die monomere Form enthaltende Lösungen gären nicht schneller an.

Zur Ergänzung dieser Versuche mit Hefepreßsaft haben wir auch noch einen volumetrischen Versuch über das Verhalten des Dioxyacetons gegenüber lebender Hefe ausgeführt und in 2-prozentiger Lösung bei Zimmertemperatur bereits nach einem Tag gegen 50 % der Theorie an Kohlendioxyd erhalten. Dieses Ergebnis ist noch erheblich günstiger als die von G. Bertrand⁴⁾ mitgeteilten Zahlen, welcher im besten Falle, nach dem gebildeten Alkohol zu schließen, nur 25 % der Triose vergären konnte. Es kann dies daran liegen, daß die von Bertrand benutzten vier Heferassen zufällig keine besonders geeigneten waren, oder wahrscheinlicher daran, daß die infolge der Anordnung benötigte längere Dauer der Versuche genügende Zeit zu der ungünstigen Umlagerung von Dioxyaceton in Glycerinaldehyd bot.

¹⁾ Aufgekochter Hefepreßsaft, der die Gärwirkung erhöht. Vgl. A. Harden und W. Young, Proc. Chem. Soc. **21**, 189 [1905]; E. Buchner und H. Haehn, Biochem. Ztschr. **19**, 192 [1909].

²⁾ A. Wohl, diese Berichte **31**, 2395 [1898].

³⁾ G. Bertrand, Ann. chim. phys. [8] **3**, 255 [1904].

⁴⁾ Ebenda [8] **3**, 257 [1904].

Bertrand hat mit winzigen Hefeausaaten gearbeitet und dieselben während des Versuches erst heranwachsen lassen, wogegen wir von vornherein große Hefemengen (1 g) ausgesät haben.

Möglicherweise konnte die Glucose bei der Gärung zunächst in ein äquimolekulares Gemenge von Dioxyaceton und Glycerinaldehyd zerfallen. Zwei mit einem künstlich hergestellten derartigen Gemenge und Hefepreßsaft ausgeführte Gärversuche ergaben aber kein befriedigendes Resultat. Frühere Versuche mit sogenannter Glycerose sind im Abschnitt über Glycerinaldehyd erwähnt.

Die im Vergleiche mit dem Verhalten der beiden anderen Vorstufen der Milchsäure außerordentlich große Gärfähigkeit des Dioxyacetons, welche in einigen Versuchen direkt der des Traubenzuckers gleichkam, lassen die hypothetische Annahme der intermediären Bildung dieses Körpers als die geeignetste erscheinen, um den Mechanismus des Zucker-Zerfalles zu erklären. Im Verfolge dieser Vorstellungen wird der Name Zymase auch in Zukunft als Sammelbegriff erscheinen, umfassend die Enzyme, welche bei der Zerlegung des Zuckers direkt beteiligt sind. Für den Begriff der Lactacidase, des Enzyms, welches die zweite Phase des Gärungsvorganges, den Zerfall der Milchsäure in Alkohol und Kohlendioxyd bewerkstelligen sollte¹⁾, wird zukünftig allerdings ein anderer einzutreten haben.

Auch andere Tatsachen stimmen mit der Annahme von Dioxyaceton als wahrscheinlichem Zwischenprodukt überein. Zunächst ist dieser Körper mit Wasserdämpfen nicht flüchtig, wie wir tatsächlich auch bei der zellfreien Gärung im Vakuum kein flüchtiges Produkt nachweisen konnten. Dann besitzt das Dioxyaceton symmetrischen Aufbau. Sein Auftreten als Zwischenprodukt würde also leicht verständlich machen, daß uns bei der zellfreien Gärung sowohl von Rohrzucker, als von Traubenzucker immer die racemische Modifikation dieser Säure begegnete¹⁾. Endlich zeigt die von uns bei der zellfreien Gärung in erhöhtem Umfange nachgewiesene Glycerinbildung²⁾ (3—8 % des Zuckers) die Neigung der sechsgliedrigen Glucosekette in dreigliedrige Kohlenstoffketten gespalten zu werden. Durch Reduktion kann Dioxyaceton leicht in Glycerin übergeführt werden³⁾.

Der Nachweis des Auftretens von Dioxyaceton bei der alkoholischen Gärung des Zuckers soll nach einer vorläufigen Mitteilung von P. Boysen-Jensen⁴⁾ vor kurzem gelungen sein. In Anbetracht der

¹⁾ Diese Berichte 38, 621 [1905]. ²⁾ Diese Berichte 39, 3203 [1906].

³⁾ O. Piloty, diese Berichte 30, 3167 [1897].

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. Botan. Ges. 26a, 666 [1908].

ungünstigen, den Nachweis sehr erschwerenden Eigenschaften des Di-oxyacetons wird die Stichhaltigkeit dieser Notiz erst nach Erscheinen der ausführlichen Veröffentlichung zu beurteilen sein.

3. Über die Glycerin-Bildung bei der zellfreien Gärung.

Die früheren Versuche über Glycerinbildung bei der Zuckergärung durch Hefepreßsaft¹⁾ hatten noch offen gelassen, ob die Bildung jenes dreiwertigen Alkohols tatsächlich auf Kosten von Zucker erfolgt. Wir haben diese Lücke nunmehr durch einige Versuche ausgefüllt und uns dabei der Glycerin-Bestimmung von S. Zeisel und R. Fanto²⁾ bedient, die auch hier treffliche Dienste geleistet hat. Die Fehler, welche andere flüchtige Jodverbindungen liefernde Bestandteile des Preßsaftes verursachen, mußten natürlich durch Kontrollversuche ausgeschaltet werden. Bei der Selbstgärung gingen die für Glycerin gefundenen Zahlen um ein Geringes in die Höhe, etwa um so viel, wie der hierbei vergorenen Zuckermenge entsprach. Nach Zusatz von Traubenzucker dagegen entstanden erhebliche Mengen von Glycerin, nämlich 5—6 % des verbrauchten Zuckers. In Übereinstimmung mit unseren früheren Versuchen ergibt sich also auch hier wieder eine Steigerung gegenüber der bei der Gärung mit lebender Hefe gebildeten Glycerinmenge. Ferner ist die von F. Ehrlich³⁾ und früher schon von J. R. Carracido⁴⁾ geäußerte Ansicht, daß das Glycerin nicht dem Zucker, sondern vielleicht Eiweißkörpern bzw. Nucleinsubstanzen entstamme, hiernit widerlegt.

4. Gärversuche mit Äthylidenoxyformiat.

Im Verfolg des Gedankenganges von H. Schade⁵⁾, nach dem der Zucker zuerst in Milchsäure und diese dann in Acetaldehyd und Ameisensäure zerfallen sollte, welche Stoffe sich unter dem Einfluß der Hefeenzyme in Alkohol und Kohlendioxyd umlagern würden, haben wir seinerzeit in Aussicht gestellt, die Einwirkung von Hefepreßsaft auf ein Gemenge von Acetaldehyd und Ameisensäure zu studieren⁶⁾. Da der direkte Zusatz dieser Stoffe sich wegen ihrer schädlichen Wirkung verbat, wurden die Versuche mit Äthylidenoxyformiat, dem Ameisensäure-Halbacetal-Anhydrid des Acetaldehyds von der Formel $\text{CH}_3.\text{C} \begin{array}{c} \diagup \text{---} \text{O} \text{---} \diagdown \\ \text{O}.\text{CHO} \quad \text{OHC.O} \end{array} \text{C}.\text{CH}_3$, ausgeführt, welcher Körper

¹⁾ Vergl. Fußnote 2, S. 1781.

²⁾ Ztschr. für analyt. Chem. **42**, 551 [1903].

³⁾ Biochem. Ztschr. **18**, 423 [1909].

⁴⁾ Ref. Biochem. Zentralbl. **3**, 439 [1904/05]; Chem.-Ztg. **34**, 76 [1910].

⁵⁾ Ztschr. für physikal. Chem. **57**, 1 [1906].

⁶⁾ Diese Berichte **39**, 4218 [1906].

sich allmählich in die obigen Komponenten spalten muß. Die Versuche verliefen negativ: Gasentwicklung trat nicht ein; sehr bald machte sich die Säurewirkung der Spaltprodukte durch Fällungserscheinungen im Preßsaft bemerkbar. Als wir bei anderen Versuchen Natriumphosphat zusetzten, ergab sich scheinbar das gewünschte Resultat, indem nur bei gleichzeitigem Zusatz von Äthylidenoxyformiat deutliche Gärung eintrat. Es erwies sich aber, daß diese Erscheinung nur auf den Ausgleich der Alkaliwirkung des Dinatriumphosphats durch die entstehende Ameisensäure zurückzuführen war, wie im experimentellen Teil ausführlicher erörtert wird. Somit ist es nicht gelungen, für die Hypothese von Schade eine experimentelle Stütze zu gewinnen.

Wenn auch ohne Zusammenhang mit dem bisher Besprochenen sei hier erwähnt, daß einige Versuche, α -Glucoseptose durch Preßsaft zu vergären, ohne Ergebnis verliefen, und daß wir beabsichtigen, auch Octose und Nonose in dieser Hinsicht zu prüfen.

5. Bildung von Alkohol und Kohlendioxyd.

Gelegentlich der oben beschriebenen quantitativen Versuche über das Verhalten der Milchsäure gegenüber lebender Hefe sind auch eine größere Anzahl von Alkohol- und Kohlendioxyd-Bestimmungen bei der alkoholischen Gärung des Zuckers mit absoluten Reinkulturen ausgeführt worden. Dabei wurden als Durchschnitt von 4 Versuchen 49.73 % des Rohrzuckers als Alkohol und 49.12 % als Kohlendioxyd wiedergefunden, was einen Quotienten $\frac{\text{Alkohol}}{\text{Kohlendioxyd}}$ im Werte von 1.01 ergibt. Die Gärungsgleichung erfordert einen Quotienten im Betrage von 1.04, wie er auch auf experimentellem Wege sowohl von L. Pasteur¹⁾ wie von M. Jodlbauer²⁾ im Laboratorium Soxhlets ermittelt wurde. Die von uns gefundenen niedrigeren Alkohol-Zahlen sind wohl damit zu erklären, daß unsere Gärungen viel länger ausgedehnt wurden als die Jodlbauers, um auch noch das in der Hefe aufgespeicherte Glykogen zu vergären; mit der Gärdauer aber wächst nach Versuchen von L. Lindet und P. Marsais³⁾ ständig die Kohlendioxyd-Menge im Verhältnis zur Alkohol-Produktion. Die Menge Kohlendioxyd, welche die Theorie überschreitet, dürfte zum Teil auf Verbrennungsvorgänge zurückzuführen sein, zum Teil aber wird sie auch einfach das Korrelat bilden für die in der Gärungsgleichung nicht berücksichtig-

¹⁾ Ann. chim. phys. [3] 58, 323 [1860].

²⁾ Ztschr. für Rübenzuckerindustrie 38, 308 [1888].

³⁾ Compt. rend. 139, 1223 [1904].

sichtigte Glycerinbildung, welche auf einer Reduktion des Zuckers beruht; die Kohlensäure ist das entsprechende Oxydationsprodukt.

6. Verhalten wässriger Zuckerlösungen beim Lagern.

Wie schon früher erwähnt¹⁾, haben wir eine sorgfältig sterilisierte 10-prozentige Traubenzuckerlösung in mehreren Einschmelzröhren bei Zimmertemperatur aufbewahrt, ab und zu eines der Röhren geöffnet und auf eingetretene Veränderungen geprüft. Ein jetzt nach 5 Jahren geöffnetes Rohr ergab keinen Kohlensäuredruck und auf Zusatz von Kalkwasser zur Lösung keine Trübung, ebenso blieb die Jodoform-Reaktion beim Destillat aus. Da die Flüssigkeit empfindlichem Lackmuspapier gegenüber ferner neutral reagierte und trotz Luftabschluß farblos war, ist der Zucker völlig unverändert geblieben. Die von W. Ostwald²⁾ neuerdings wieder als wahrscheinlich hingestellte freiwillige Zersetzung einer wässrigen Zuckerlösung zeigte sich somit innerhalb dieses Zeitraums bisher nicht als nachweisbar.

Hrn. Dr. E. L. Pinuer, welcher uns bei den Versuchen mit Dioxyceton und mit Glycerinaldehyd bestens unterstützte, sei auch hier unser Dank zum Ausdruck gebracht.

Experimenteller Teil.

1. Rolle der Milchsäure bei der alkoholischen Gärung mit lebender Hefe.

Versuchsordnung und analytische Methoden sind bereits im allgemeinen Teil kurz beschrieben; bezüglich der Einzelheiten vergleiche man die frühere Abhandlung³⁾. Nochmals eingehend geprüft wurde die Methode der Milchsäure-Bestimmung.

10 ccm Milchsäurelösung (entsprechend 0.985 g Milchsäure) wurden mit 10 ccm verdünnter Schwefelsäure und 10 ccm gesättigter Natriumsulfatlösung 72 Stunden lang im von der Heideschen Äther-Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Der Auszug wurde mit entwässertem Natriumsulfat über Nacht getrocknet, das Natriumsulfat abfiltriert, gründlichst ausgewaschen und schließlich der Äther abdestilliert. Es hinterließ ein fast farbloser Sirup, der in Wasser aufgenommen und mit Zinkcarbonat gekocht wurde. Nach Abfiltrieren und sorgfältigem Auswaschen des Zinkcarbonats wurde die Lösung des Zinklactats auf etwa 5 ccm eingeengt und nach Zusatz von 15 ccm Alkohol über Nacht krystallisieren gelassen. Die farblose Krystallmasse wurde im Gooch-Tiegel abgesaugt, mit 75-prozentigem Alkohol nachgewaschen und bei 105° getrocknet. Durch Verarbeitung der Mutterlauge ließ sich noch etwas Zinklactat gewinnen. Die oben angegebene Menge von 0.985 g Milchsäure lieferte

¹⁾ Diese Berichte 38, 623 [1905].

²⁾ Werdegang einer Wissenschaft, Leipzig 1908, 296.

³⁾ Thiels Landwirtschaftl. Jahrbücher, 38, Ergänzungsbd. 5, 277 [1909].

so 1.260 g und in einem zweiten Versuch 1.240 g $(C_3H_5O_3)_2Zn$, entsprechend 0.934 bzw. 0.918 g Milchsäure (gleich 95.0 und 93.3 % der Theorie).

Daraus folgt, daß bei den Milchsäure-Bestimmungen nach unserer Methode immerhin mit einem Fehler von 5—10 % gerechnet werden muß.

Tabelle 1. Rolle der Milchsäure bei der alkoholischen Gärung mit lebender Hefe.

Sämtliche Versuche, außer IV, 2, 4, 6 und 8 sind mit absoluten Reinkulturen der Heferasse 792 durchgeführt.

Nr. des Versuchs	Die Hefe blieb unter Wasser liegen	Dauer der Gärung	Zugesetzte Menge in g			Nach beendeter Gärung gefunden in g		
			Rohrzucker	Milchsäure	Alkali	Kohlendioxyd	Alkohol	Milchsäure
I. 1	5 Tage	7 Tage	—	—	—	0.13	0.10	0.52
2	»	»	—	0.495	—	0.12	0.11	0.45
3	»	»	—	—	—	0.18	0.07	0.47
4	»	»	—	0.495	—	0.20	0.16	0.51
II. 1	4 Tage	8 Tage	20.00	—	—	9.84	9.93	0.66
2	»	»	20.00	0.495	—	9.74	9.84	0.53
3	»	»	20.00	—	—	9.86	10.02	0.58
4	»	»	20.00	0.495	—	9.70	9.94	0.48
III. 1	6 Tage	13 Tage	20.00	—	—	9.79	9.81	0.00
2	»	»	20.00	0.495	—	9.69	9.76	0.42
3	»	»	20.00	—	—	9.80	10.02	0.00
4	»	»	20.00	0.495	—	9.70	9.80	0.49
IV. 1	5 Stdn.	14 Tage	20.00	—	—	nicht bestimmt	nicht bestimmt	0.00
2 ¹⁾	»	»	20.00	—	—			0.00
3	»	16 Tage	20.00	0.99	0.8 g NaOH			0.76
4 ¹⁾	»	14 Tage	20.00	0.99	0.8 g NaOH			0.90
5 ²⁾	»	18 Tage	20.00	—	—			0.00
6 ¹⁾	»	»	20.00	—	—			0.00
7	»	21 Tage	20.00	0.99	0.3 g NH ₃			0.55
8 ¹⁾	»	22 Tage	20.00	0.99	0.3 g NH ₃			0.39
V. 1	2 Tage	21 Tage	—	0.99	0.37 g Na ₂ CO ₃	nicht bestimmt	nicht bestimmt	0.59
2	»	29 Tage	—	0.99	0.37 g Na ₂ CO ₃			0.29
3	»	21 Tage	—	0.99	0.12 g NH ₃			0.61
4	»	29 Tage	—	0.99	0.12 g NH ₃			0.13
VI. 1	7 Tage	18 Tage	—	—	—	0.26	0.10	0.00
2	»	»	—	0.99	0.44 g NaOH	0.25	0.11	0.85
3	»	»	—	—	—	0.29	0.03	0.00
4	»	»	—	0.99	0.44 g NaOH	0.33	0.09	0.85
VII. 1	7 Tage	28 Tage	—	—	—	0.10	0.04	0.00
2	»	»	—	0.99	0.44 g NaOH	0.15	0.07	0.56
3 ³⁾	»	»	—	—	—	0.27	0.00	0.00
4 ³⁾	»	»	—	0.99	0.44 g NaOH	0.82	0.02	0.47

¹⁾ Mit der obergärigen Heferasse 797 ausgeführt.

²⁾ Den Gärflüssigkeiten der Versuche IV, 5 und 6 waren außerdem je 2 g Asparagin zugefügt.

³⁾ Diese Versuche wurden wiederholt gelüftet.

Von den 7 in der Tabelle 1 angeführten Versuchen sind die 3 ersten bereits früher beschrieben; wir beschränken uns hier darauf, die Versuche IV—VII kurz zu erläutern:

IV. Am 14. 11. 08 wurden 4 Pasteur-Kolben mit je 200 cem steriler Würze mit der untergärigen Heferasse 792 und 4 weitere Kolben mit der obergärigen Heferasse 797 geimpft. Alle 8 Kulturen entwickelten sich gut; am 19. 11. wurde das überstehende Bier abgelassen und die klar abgesetzte Hefe in 8 neue Pasteur-Kolben mit je 500 cem steriler Würze übergespült. Nach 4 Tagen war die Gärung wiederum beendet; die Kulturen kamen jetzt in Kolben mit je 1 l Nährlösung. Am 23. 11. wurde die Hefeerte gewaschen und nach 5-stündigem Absetzen mit sterilem Wasser in die eigentlichen Versuchslösungen übergespült. Diese befanden sich in 8 Pasteur-Kolben; jeder Kolben war mit 400 cem Leitungswasser und 20 g Rohrzucker beschiekt; Kolben 3 und 4 enthielten außerdem 0.99 g Milchsäure und 2 cem 30-prozentiger Natronlauge, Kolben 5 und 6 je 2 g Asparagin, Kolben 7 und 8 je 0.99 g Milchsäure und 1.5 cem 25-prozentiges Ammoniak; die Alkalien waren erst nach erfolgter Sterilisation der Zuckerlösungen aus steriler Pipette hinzugegeben. Die Gärung ging rasch zu Ende; trotzdem blieben alle 8 Versuche 2—3 Wochen stehen. Die Aufarbeitung erfolgte in der früher angegebenen Weise; die Milchsäure wurde als Zinksalz gewogen. 1 und 2 ergaben keine Milchsäure, dagegen wurde in beiden Fällen etwas bernsteinsaures Zink (0.085 bzw. 0.075 g) gefunden.

Aus 3 ließen sich noch 1.25, aus 4 1.49 g wasserhaltiges Zinklactat isolieren; die Mutterlauge beider Salze enthielt auch Bernsteinsäure. 5 und 6 ergaben keine Milchsäure und nur Spuren von Bernsteinsäure, 7 lieferte 0.91 g, 8 0.64 g Zinklactat. Die aus allen diesen Versuchen gewonnenen Zinklactate waren optisch-inaktiv.

V. Es wurden 4 Proben der Heferasse 792 in der oben angegebenen Weise unter zweimaligem Umzüchten, erst in 200, dann in 800 cem Nährlösung binnen 11 Tagen herangezüchtet und nach zweitägigem Wässern am 1. 2. 09 in die Versuchskolben übergeführt. Letztere waren natürlich vorher sterilisiert; sie enthielten je 400 cem Leitungswasser und 0.99 g Milchsäure, aber keinen Zucker. Außerdem hatten 1 und 2 nach der Sterilisation noch einen Zusatz von 10 cem genau 10-prozentiger, steriler Sodalösung, 3 und 4 von 10 cem 10-prozentiger Sodalösung und der äquivalenten Menge steriler Salmiaklösung (10 cem einer 3.74-prozentigen Lösung) erhalten. 1 und 3 wurden am 22. 2., 2 und 4 am 2. 3. aufgearbeitet. Gefunden: in 1 0.80 g Zinklactat (bei 105° getrocknet), entsprechend 0.59 g Milchsäure. In 2 0.39 g Zinklactat (wie oben), entsprechend 0.29 g Milchsäure. In 3 0.82 g Zinklactat (wie oben), entsprechend 0.61 g Milchsäure. In 4 0.18 g Zinklactat (wie oben), entsprechend 0.13 g Milchsäure.

VI. Während die im vorigen Versuche verwendete Menge Alkali nicht zur völligen Neutralisation der zugefügten Milchsäure ausreichte, wurde in den beiden nächsten Versuchsreihen eine Lösung von milchsaurem Natrium mit einem ganz kleinen Überschuß (0.02 g) von wasserhaltiger Soda ange-

wandt; die Menge Milchsäure war die gleiche wie in der vorigen Versuchsreihe (0.99 g). Das Heranzüchten der Hefe erfolgte wie in V; die Hefenernte wurde binnen 7 Tagen dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und am 6. 5. zum Versuche angesetzt, diesmal in dem mit Quecksilberschlüssen gedichteten Gärapparat. 1 und 3 enthielten außer der Hefe nur 400 ccm Leitungswasser, 2 und 4 daneben noch das milchsäure Natrium. Nach Verlauf von 18 Tagen wurde in allen 4 Versuchen Kohlendioxyd (nach vorherigem Ansäuern mit 10 ccm verdünnter Schwefelsäure), Alkohol und Milchsäure bestimmt. In 1 wurden gefunden: 0.26 g Kohlensäure, 0.10 g Alkohol und keine Milchsäure; in 2 0.25 g Kohlensäure, 0.11 g Alkohol und 1.15 g Zinklactat (bei 105° getrocknet), entsprechend 0.85 g Milchsäure; in 3 0.29 g Kohlensäure, 0.03 g Alkohol und keine Milchsäure; in 4 0.33 g Kohlensäure, 0.09 g Alkohol und 1.15 g Zinklactat (wie oben), entsprechend 0.85 g Milchsäure.

VII. 28. 6. 09. Versuchsordnung wie in VI. In Kolben 3 und 4 wurden etwa alle 4 Tage 0.5 l Luft unter Einhaltung aller Vorsichtsmaßregeln, die Versuchsflüssigkeiten vor Infektion zu schützen, eingeleitet. Am 26. 7. 09 erfolgte die Aufarbeitung. Gefunden: In 1 0.10 g Kohlensäure, 0.04 g Alkohol; in 2 0.15 g Kohlensäure, 0.07 g Alkohol und 0.75 g Zinklactat (wie oben), entsprechend 0.56 g Milchsäure; in 3 0.27 g Kohlensäure und 0.00 g Alkohol; in 4 0.82 g Kohlensäure, 0.02 g Alkohol und 0.63 g Zinklactat (wie oben), entsprechend 0.47 g Milchsäure.

2. Versuche mit Methyl-glyoxal.

Die im Nachstehenden wiedergegebenen Gärversuche nach der volumetrischen Methode wurden in folgender Weise ausgeführt: Graduierte Eudiometerröhren von 50 ccm Inhalt wurden zum größten Teil mit Quecksilber gefüllt, dann aus einer Pipette genau 5 ccm Preßsolt einfließen gelassen, Toluol usw. zugegeben und schließlich Quecksilber nachgefüllt, bis die Röhren voll waren. Beim Umdrehen der mit dem Daumen verschlossenen Röhren und Eintauchen in die Quecksilberwanne kam ab und zu eine Luftblase in das Rohr; hierdurch auftretende kleine Unregelmäßigkeiten wurden dadurch ausgeschaltet, daß stets der Anfangsstand notiert und bei den späteren Ableesungen berücksichtigt wurde. Als zweckmäßig erwies es sich, nicht das gebildete Gasvolumen, sondern den viel schärfer zu erkennenden Meniskus der Quecksilbersäule abzulesen. Schwankungen des Drucks und der Temperatur (es wurde stets bei Zimmertemperatur gearbeitet) blieben unberücksichtigt. Da die Röhren weit aus dem Quecksilberspiegel hervorragten, so begannen die Gärungen stets unter vermindertem Druck (von etwa 300—400 mm). Mit wachsender Gasmenge näherte sich der Druck im Innern der Röhren immer mehr dem Atmosphärendruck; auch darauf ist im allgemeinen keine Rücksicht genommen. Die in den Tabellen angeführten Zahlen beanspruchen also nicht den Wert einer exakten, quantitativen Bestimmung, sind aber

unter sich genügend vergleichbar. — Die in den späteren Abschnitten beschriebenen genauen gewichtsanalytischen Versuche sind nach dem früher¹⁾ angegebenen Verfahren ausgeführt. — Die Methylglyoxal-Lösungen waren teils durch Destillation des rohen Methylglyoxals mit Wasserdampf, teils durch Auflösen des im Vacuum destillierten Präparates in Wasser gewonnen; der Gehalt der Lösungen an Methylglyoxal wurde durch Überführung in das sehr schwer lösliche Dimesemicarbazon kontrolliert.

Tabelle 2. Hefepreßsaft und Methylglyoxal.

Je 5 ccm Hefepreßsaft + 2 ccm Wasser, bezw. etwa 5-prozentige Methylglyoxallösung + 1 Tropfen Toluol über Quecksilber im Eudiometerrohr.

Nr. des Versuchs	Datum	Art des Preßsaftes	Zusatz	Kohlensäure in ccm nach Stunden				
				3	6	24	72	120
I. 1	26. 2. 09	aus Berliner Hefe	Wasser	2.5	6.0	19	36	—
2	»	»	CH ₃ .CO.CHO-Lsg.	2.5 ²⁾	3.5	5	7	—
II. 1	14. 7. 09	»	Wasser	1.5	5.5	17	27	31
2	»	»	CH ₃ .CO.CHO-Lsg.	0.5 ²⁾	1.0	4	6	6
III. 1	22. 7. 09	aus Münchener Hefe	Wasser	0.2	0.2	0.5	10	11
2	»	»	»	0.1	0.2	0.3	10	11
3	»	»	CH ₃ .CO.CHO-Lsg.	0.2 ²⁾	0.3	0.4	1.5	1.5
4	»	»	»	0.2 ²⁾	0.3	0.5	1	1
5 ³⁾	»	»	Wasser	0.1	0.1	0.2	8	11
6 ³⁾	»	»	»	0.1	0.1	0.2	8	10
7 ³⁾	»	»	CH ₃ .CO.CHO-Lsg.	0.3 ²⁾	0.5	0.8	2	2
8 ³⁾	»	»	»	0.3 ²⁾	0.4	0.7	2	2

Der Nachweis, daß das mit Wasserdämpfen flüchtige Methylglyoxal bei der Preßsaft-Gärung nicht auftritt, wurde in folgender Weise geführt: In einem 5-l-Rundkolben wurde eine Gärung von 400 ccm Preßsaft und 80 g Rohrzucker in Gang gesetzt. Der Kolben wurde in ein 30° warmes Wasserbad eingetaucht, durch ein weites Rohr luftdicht mit einem Kühler verbunden und mit einer sehr gut wirkenden Luftpumpe auf etwa 5 mm evakuiert. Das Destillat sammelte sich in einer mit Kältemischung gekühlten Vorlage; das abdestillierende Wasser wurde kontinuierlich durch nachfließendes ersetzt, so daß in der Gärflüssigkeit keine Konzentrationsänderung eintrat. In 4—6 Stunden destillierten etwa 2—3 l Wasser über; auch bei häufiger

¹⁾ Diese Berichte **39**, 3213 [1906].

²⁾ War bereits nach 1 Stunde stark getrübt und gelbbraun gefärbt.

³⁾ Dem Versuch wurde 0.2 g Na₂HPO₄ + 12H₂O zugesetzt.

Wiederholung des Versuchs konnte in dem Destillat mit Hilfe von Semicarbazid kein Methylglyoxal nachgewiesen werden.

3. Vergärung des Glycerinaldehyds.

Das Diäthylacetal des Glycerinaldehyds beeinflusst die Selbstgärung von Hefepreßsaft nicht: 10 ccm eines Glucose sehr gut vergärenden Saftes lieferten durch Selbstgärung ohne Zusatz in 3 Stunden 4.5, in 48 Stunden 25 ccm, bei Gegenwart von 2 g Acetal in entsprechenden Zeiten 5.5 und 24 ccm Kohlendioxyd. Bei Unterbrechung des Versuchs reduzierte der mit dem Acetal versetzte Preßsaft Fehlingsche Lösung nicht, wohl aber sehr stark nach kurzem Aufkochen mit verdünnter Schwefelsäure.

Tabelle 3. Vergärung des Glycerinaldehyds durch Hefepreßsaft.

Je 5 ccm Hefepreßsaft + angegebener Zusatz + 1 Tropfen Toluol, bzw. bei den Versuchen V—VII 0.3 % Phenol im Eudiometerrohr über Quecksilber; die Zahlen für die gebildete Kohlensäure sind Mittel aus zwei gut übereinstimmenden Versuchen.

Nr. des Versuchs	Datum	Art des Preßsaftes	Glucose g	Zusatz von		Kohlensäure in ccm nach Stunden				
				Glycerinaldehyd g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$ g	3	6	24	72	x ²⁾
I. 1	8. 2. 09	aus gelagerter Berliner Hefe	—	—	—	0.2	0.3	0.6	—	—
2	»	»	0.5	—	—	30	∞	∞	—	—
3	»	»	—	0.5 ¹⁾	—	2	4	6	—	—
II. 1	2. 3. 09	aus Berliner Hefe	—	—	—	7.5	15	33	—	45
2	»	aus Berliner Hefe	—	—	0.5	1.7	9	32	—	43
3	»	frischer Berliner Hefe	0.05	—	—	14	20	37	—	56
4	»	»	0.05	—	0.5	7	18	37	—	46
5	»	»	—	0.05	—	9	15	33	—	49
6	»	»	—	0.05	0.5	5	14	37	—	50
III. 1	9. 3. 09	aus gelagerter Berliner Hefe	—	—	—	0.7	1.3	5	6	6
2	»	»	—	—	0.5	0.3	0.3	0.5	0.5	0.5
3	»	»	0.10	—	—	19	21	23	29	32
4	»	»	0.10	—	0.5	2	5	7	17	19
5	»	»	—	0.10	—	1.5	3	7	9	7
6	»	»	—	0.10	0.5	1	2	3	6	6

¹⁾ Rohsirup; zu allen anderen Versuchen diente reiner, krystallisierter Glycerinaldehyd.

²⁾ Die in dieser Kolonne angeführten Zahlen sind nach völlig beendeter Gärung (4—14 Tagen) abgelesen; die Volumina sind (im Gegensatz zu den anderen Kolonnen) auf gleichen Druck reduziert, und zwar in II auf etwa 750, in III und VII auf 600, in IV und V auf 450 und in VI auf 400 mm Quecksilberdruck.

Nr. des Versuchs	Datum	Art des Preßsaftes	Glucose g	Zusatz von		Kohlensäure in cem nach Stunden				
				Glycerinaldehyd g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$ g	3	6	24	72	x
IV. 1	19. 3. 09	aus gelagerter Berliner Hefe	—	—	—	—	—	7	—	7
2	»	»	—	—	0.2	—	—	3	—	2
3	»	(Gemenge von Preßsaft und Kochsaft)	0.05	—	—	—	—	18	—	21
4	»	»	0.05	—	0.2	—	—	9	—	12
5	»	»	—	0.05	—	—	—	14	—	15
6	»	»	—	0.05	0.2	—	—	10	—	12
V. 1	12. 5. 09	wie in IV	—	—	—	0.4	—	7	—	13
2	»	»	—	—	0.5	0.4	—	2.5	—	4
3	»	»	0.10	—	—	16	—	25	—	ca. 50
4	»	»	0.10	—	0.5	6	—	16	—	» 45
5	»	»	—	0.10	—	2.5	—	10	—	13
6	»	»	—	0.10	0.5	2	—	7	—	13
VI. 1	19. 5. 09	wie in IV	—	—	—	0.1	0.3	1.5	—	6
2	»	»	—	—	0.5	0	0.1	0.1	—	0.4
3	»	»	0.05	—	—	6	—	8	—	ca. 30
4	»	»	0.05	—	0.5	1	—	1	—	» 25
5	»	»	—	0.05	—	0.2	1.3	5	—	9
6	»	»	—	0.05	0.5	0.1	0.3	0.6	—	4
VII. 1	17. 6. 09	aus Münchener Hefe	—	—	—	0.5	—	5	10	15
2	»	»	—	—	0.2	0.2	—	1.5	7	10
3	»	(Gemenge von Preßsaft und Kochsaft)	0.05	—	—	8	—	18	23	31
4	»	»	0.05	—	0.2	7	—	15	20	25
5	»	»	—	0.05	—	2	—	9	13	19
6	»	»	—	0.05	0.2	1	—	6	10	16

Bezüglich der in Tabelle 3 wiedergegebenen Resultate der Gärversuche mit freiem Glycerinaldehyd und Hefepreßsaft ist noch zu bemerken, daß das in den Versuchen IV—VII verwendete Gemenge von Preßsaft und Kochsaft in folgender Weise gewonnen wurde: Frischer Preßsaft sowohl wie Kochsaft aus derselben Hefe wurden jeder für sich im Vakuum bei niederer Temperatur rasch etwa auf die Hälfte eingedampft und vor Ansetzung des Versuchs zu gleichen Teilen mit einander vermischt. Preßsaft aus frischer Berliner Hefe erwies sich für diese Versuche als unbrauchbar, da die hohe Selbstgärung die Resultate verwischte und verdeckte (II); durch dreitägiges Lagern der Hefe unter Wasser bei etwa 20° gelang es, den Glykogengehalt auf ein Minimum zu reduzieren. Die an und für sich schon stark gewässerte Münchener Brauereihefe von Schroder war ohne Vorbehandlung benutzbar.

Für die Gärversuche mit lebender Hefe (siehe Tabelle 4) fand bei etwa 200 Atmosphären entwässerte Berliner Brauereihefe Ver-

wendung. Bei Unterbrechung war die mit dem Glycerinaldehyd in Berührung gewesene Hefe abgestorben; sie saß als zusammengeballte gelbe Masse am Boden und war nicht mehr imstande, Zuckerlösungen in Gärung zu bringen.

Tabelle 4. Vergärung von Glycerinaldehyd und Dioxyaceton durch lebende Hefe.

Je 5 ccm Wasser mit den angegebenen Zusätzen über Quecksilber im Eudiometerrohr. Die Zahlen für das gebildete CO₂ sind Mittelwerte aus 2 Versuchen.

Nummer des Versuches	Datum	Abgepreßte Brauerhefe	Zusatz von			CO ₂ in ccm nach Stunden						
			Glucose	Glycerinaldehyd	Dioxyaceton	1	3	6	24	48	x ¹⁾	
		g	g	g								
I.	1.	9. 2. 09	1	—	—	0.9	3	—	10	13	18	
	2.	»	»	—	0.15 ²⁾	—	2.5	6	—	15	20	30
II.	1.	25. 2. 09	0.5	—	—	0.7	2	3	5	7	9	
	2.	»	»	0.05	—	10	15	19	21	23	26	
	3.	»	»	—	0.05	—	0.9	2.5	4	7	10	14
	4.	»	»	0.025	0.025	—	4	7	10	13	15	18
III.	1.	6. 8. 09	1	—	—	0.0	0.1	—	3	5	13	
	2.	»	»	—	—	0.10	0.3	3.3	—	21	25	30

Von gewichtsanalytischen Versuchen sei nur einer, der best gelungene, beschrieben (vergl. Tab. 5, 1): Je 50 ccm Preßsaft-Kochsaft-Gemisch (von Versuch VII. der Tab. 3) gaben bei Gegenwart von 0.3 % Phenol als Antisepticum binnen 24 Std. 0.039 bzw. 0.042 g CO₂ ab, 2 gleiche mit je 0.50 g Glycerinaldehyd versetzte Proben in derselben Zeit 0.067 bzw. 0.068 g. Nach beendeter Gärung (12 Tagen) und Verdrängen des Kohlendioxyds durch Lufteinleiten waren die entsprechenden Zahlen 0.239 und 0.244, andererseits 0.276 und 0.272. In allen 4 Versuchen wurde der Alkohol abdestilliert und pyknometrisch bestimmt; es wurde gefunden: bei der Selbstgärung 0.122 und 0.116 g, bei der Glycerinaldehyd-Vergärung 0.187 und 0.186 g Alkohol. Es entstanden also bei der Vergärung von Glycerinaldehyd im Durchschnitt mehr: 0.034 g CO₂ und 0.068 g Alkohol.

¹⁾ Bei völlig beendeter Gärung nach 12 (I), 5 (II) und 10 (III) Tagen abgelesen; die Zahlen dieser Kolonne beziehen sich auf 20° und 600 mm Quecksilberdruck.

²⁾ Rohsirup.

Tab. 5. Gewichtsanalytischer Nachweis der Vergärbarkeit des Glycerinaldehyds und Dioxyacetons durch Hefepressaft.
 Als Antisepticum dienen bei I—V 0,3 % Phenol, bei VI 1 % Toluol; die gefundenen Zahlen sind Mittelwerte je zweier Versuche.

Nummer des Versuchs	Datum	Art des Presssaftes	Saftmenge ccm	Zusatz von		CO ₂ in mg nach Stunden				Alkohol in mg	
				Glycerinaldehyd g	Dioxyaceton g	24	48	96	388		nach Verdrängung des CO ₂ durch Luft
I. 1.	17. 6. 09	aus M \ddot{u} ch, Hefe (Gemengv. Presssaft und Kochsaft)	50	—	—	40	59	74	146	241	119
I. 2.	»	»	»	0.50	—	68	88	102	183	274	187
II. 1.	30. 7. 09	wie I	50	—	—	—	38	58	—	176	125
II. 2.	»	»	»	—	1.00	—	348	372	—	596	555
III. 1.	14. 1. 10	frischer Berliner Presssaft	20	Glucose:	—	18	—	12	—	—	—
III. 2.	»	»	»	0.20	—	55	—	64	—	—	—
III. 3.	»	»	»	—	0.20	30	—	32	—	—	—
IV. 1.	1. 2. 10	wie I	20	—	—	28	48	—	—	69	—
IV. 2.	»	»	»	0.40	—	104	142	—	—	172	—
IV. 3.	»	»	»	—	0.40	104	136	—	—	204	—
V. 1.	10. 3. 10	20 ccm M \ddot{u} ncchener Presssaft +	40	—	—	13	16	27	—	—	—
V. 2.	»	20 ccm Wasser	»	0.40	—	72	104	114	—	—	—
V. 3.	»	20 ccm desselben Presssaftes +	»	—	0.40	34	40	40	—	—	—
V. 4.	»	20 ccm Kochsaft	»	—	—	61	77	96	—	—	—
V. 5.	»	»	»	0.40	—	81	109	121	—	—	—
V. 6.	»	»	»	—	0.40	59	95	107	—	—	—
VI. 1.	8. 3. 10	10 ccm Breslauer konz. Presssaft ¹⁾	20	2.0	—	640	850	1020	—	—	—
VI. 2.	»	+ 10 ccm konz. Kochsaft ¹⁾	»	—	2.0	350	590	800	—	—	—

¹⁾ Erhalten durch Eindampfen des normalen Saftes im Vakuum auf das halbe Volumen.

Tabelle 6. Vergärung des Dioxyacetons durch Hefepreßsaft.

Je 5 ccm Hefepreßsaft + angegebener Zusatz + 0.3% Phenol (bezw. in 1 ein Tropfen Toluol) im Eudiometerrohr über Quecksilber; die angeführten Kohlendioxyd-Zahlen stellen das Mittel aus je 2 Versuchen dar.

Nummer des Versuchs	Datum	Art des Preß- saftes	Zusatz von			CO ₂ in ccm nach Stunden					
			Glu- cose g	Di- oxy- aceton g	Na ₂ HPO ₄ + 12 H ₂ O g	3	6	24	72	x ¹⁾	
I. 1	22. 7. 09	aus Münchener	—	—	—	0.1	0.2	0.4	10	8	
2	»	Hefe	—	—	0.2	0.1	0.1	0.2	8	7	
3	»	»	0.10	—	—	19	23	28	30	29	
4	»	»	0.10	—	0.2	0.4	9	25	27	24	
5	»	»	—	0.10	—	7	14	20	23	21	
6	»	»	—	0.10	0.2	0.4	0.6	2	10	7	
II. 1	30. 7. 09	aus Münchener	—	—	Glycerin-	0.4	—	2.5	5	8	
2	»	Hefe	0.10	—	aldehyd	15	—	23	30	35	
3	»	(Gemenge von	—	0.10	—	2.2	—	22	30	36	
4	»	Preßsaft und	—	0.25	—	2.5	—	23	39	50	
5	»	Kochsaft)	—	0.50	—	3	—	23	38	43	
6	»	»	—	0.05	0.05	2.5	—	10	14	12	
III. 1 ²⁾	29. 10. 09	aus gelagerter	—	—	—	0.1	—	0.4	4	—	
2	»	Berliner Hefe	0.10 ³⁾	—	—	10	—	20	23	—	
3	»	»	0.10 ⁴⁾	—	—	11	—	22	24	—	
4	»	»	—	0.10 ³⁾	—	0.8	—	10	11	—	
5	»	»	—	0.10 ⁴⁾	—	0.5	—	12	14	—	
6	»	»	—	—	0.10 ³⁾	0.2	—	1.8	2.5	—	
7	»	»	—	—	0.10 ⁴⁾	0.4	—	2.3	3	—	
IV. 1	15. 3. 10	wie II	—	—	—	0.6	—	1.5	3	3	
2	»	»	0.10	—	—	10	—	19	24	24	
3	»	»	—	0.10	—	0.9	—	17	22	23	
4	»	»	—	0.10 ⁵⁾	—	1.6	—	14	22	22	
V. 1	3. 3. 10	} eingedampfter Berl. Preßsaft + Wasser } eingedampfter Berl. Preßsaft + Kochsaft	—	—	—	—	—	14	19	—	
2	»		0.10	—	—	—	—	—	28	36	—
3	»		—	0.10	—	—	—	—	23	31	—
4	»		—	—	—	—	—	—	17	28	—
5	»		0.10	—	—	—	—	—	26	37	—
6	»		—	0.10	—	—	—	—	27	38	—
VI. 1	7. 3. 10	} eingedampfter Münc. Preßs. + Wasser } eingedampfter Münc. Preßs. + Kochsaft	—	—	—	0.1	—	0.3	0.8	—	
2	»		0.20	—	—	3	—	31	44	—	
3	»		—	0.20	—	0.2	—	3	6	—	
4	»		—	—	—	0.1	—	0.6	1.7	—	
5	»		0.20	—	—	3	—	26	35	—	
6	»		—	0.20	—	0.2	—	11	27	—	
VII. 1	10. 3. 10	} Münchener Preßsaft + Wasser } Münchener Preßsaft + Kochsaft	—	—	—	0.2	0.2	0.6	1.1	1	
2	»		0.10	—	—	10	14	19	22	22	
3	»		—	0.10	—	0.3	0.4	2.5	4	4	
4	»		—	—	—	0.2	0.2	1.2	2.1	3	
5	»		0.10	—	—	12	12	16	20	24	
6	»		—	0.10	—	0.4	1.2	10	16	20	

¹⁾ Endablesungen nach ca. 8 Tagen bei gleichem Niveau (unter etwa 600–650 mm Quecksilberdruck) und einer Temperatur von 20–22°.

²⁾ Unter Zusatz von 1 ccm Wasser.

³⁾ In 1 ccm Wasser kalt gelöst.

⁴⁾ In 1 ccm Wasser heiß gelöst.

⁵⁾ Im Kochsaft heiß gelöst.

Vergärung des Dioxy-acetons.

Von den Resultaten der Tabelle 6 sei hervorgehoben, daß ein Vergleich der Versuchsreihen I und III mit II und IV, insbesondere aber die Serien V—VII sehr deutlich zeigen, daß nur bei Kochsaft-Zusatz, also bei Gegenwart von sehr viel Koenzym, das Dioxyaceton ebensogut wie Glucose vergoren wird. Aus den Reihen III und IV geht hervor, daß das kalt gelöste, also dimere Dioxyaceton (ebenso wie Glycerinaldehyd) zwar etwas langsamer angärt als die heiß gelöste, monomere Substanz, daß aber doch aus dieser Ursache die viel höhere Angärung der Glucose nicht zu erklären ist. In den Versuchen VI 3 und 6 und VII 3 und 6 wurde nach beendeter Gärung mit Phloroglucin auf etwa entstandenen Glycerinaldehyd geprüft; das Resultat war durchaus negativ. Versuch II 6 ergibt, daß künstlich hergestellte »Glycerose« nur schlecht vergärbar ist.

Glycerin-Bildung bei der zellfreien Gärung.

Der Saft, der zu diesen Versuchen Verwendung fand, hatte eine normale Gärkraft: 20 ccm lieferten unter den üblichen Bedingungen in 96 Stunden durch Selbstgärung 0.04 g, bei Gegenwart von 8 g Rohrzucker 0.94 g Kohlensäure. Zur Ausführung der Glycerin-Bestimmung nach S. Zeisel und R. Fanto¹⁾ wurden 20 ccm des Saftes bzw. der Inhalt eines Gärkolbens zum Vertreiben des Alkohols mit Wasser verdünnt, gekocht, filtriert, ausgewaschen, eingedampft und wieder auf 20 ccm gebracht; ein Viertel davon, also 5 ccm, dienten zur Bestimmung. Oder es wurden 5 ccm des Saftes direkt in dem Stritarschen²⁾ Kölbchen mit 20 ccm Wasser verdünnt und unter Überleiten eines Luftstroms wieder auf 5 ccm eingedampft. Je 5 ccm des frischen Saftes gaben nach Entfernung des Alkohols bei der Behandlung mit Jodwasserstoffsäure nach der Vorschrift von Zeisel und Fanto 0.0780 g bzw. 0.0761 g AgJ (entsprechend 0.61% und 0.60% Glyceringehalt des Saftes), nach der Selbstgärung 0.0872 g, 0.0879 g und 0.0863 g AgJ (0.68%, 0.69% und 0.67% Glycerin), nach der Vergärung mit Rohrzucker unter den oben angegebenen Bedingungen 0.1477 g und 0.1619 g AgJ (1.16% und 1.27% Glycerin).

Gärversuche mit Äthylidenoxyformiat.

Das bei diesen Versuchen sich bildende Kohlendioxyd ist lediglich auf die Vergärung des im Saft enthaltenen Glykogens zurückzuführen, wie besonders deutlich daraus hervorgeht, daß der glykogenreiche Berliner Saft stets viel Kohlendioxyd ergab, während der gly-

¹⁾ Ztschr. f. analyt. Chem. **42**, 551 [1903]. ²⁾ Ebenda **42**, 580 [1903].

kogenarme, aber sehr gärkräftige Münchener Saft fast gar kein Gas entwickelte. — Dinatriumphosphat verhindert oder verringert die Gärung kleiner Zuckermengen und des Glykogens, wie wir uns durch einen besonderen Versuch mit Glykogen-Zusatz überzeugten. Die günstige Wirkung des Äthylidenoxyformiat-Zusatzes auf die Vergärung der mit Natriumphosphat versetzten Preßsäfte beruht ausschließlich in einer Säurewirkung, denn eine Zugabe von Äthylidenoxyacetat hat denselben Erfolg; da letzterer Ester etwas schwerer löslich ist und langsamer verseift wird, setzt die Gärung weniger schnell ein.

Tabelle 7. Gärversuche mit Äthylidenoxyformiat.

Je 10 ccm Hefepreßsaft; Antisepticum: Toluol; im Eudiometerrohr über Quecksilber.

Nummer des Versuchs	Datum	Herkunft des Preßsaftes	Zusatz von			CO ₂ in ccm nach Stunden				
			Na ₂ HPO ₄ + 12H ₂ O g	Äthyliden- oxy- formiat ccm	Äthyliden- oxyacetat ccm	1	3	7	24	48
I. 1	7. 1. 08	aus Berliner Hefe	—	—	—	3.1	2	22	28	—
2	»	»	1.0	—	—	0.3	0.5	1.2	7	—
3	»	»	1.0	—	—	0.3	0.4	1.0	—	—
4	»	»	—	0.2	—	2.2	5	7	6	—
5	»	»	1.0	0.2	—	0.5	4	16	26	—
6	»	»	1.0	0.2	—	1.2	7	18	25	—
II. 1	10. 1. 08	aus Münch. Hefe	—	—	—	0.2	1.2	4	5	—
2	»	»	0.5	—	—	0.1	0.2	0.3	0.3	—
3	»	»	0.5	—	—	0.2	0.3	0.4	0.4	—
4	»	»	—	0.2	—	0.3	1.1	2.4	2	—
5	»	»	0.5	0.2	—	0.4	1.4	4	4	—
6	»	»	0.5	0.2	—	0.3	0.8	4	5	—
III. 1	30. 1. 08	aus Münch. Hefe	1.0	—	—	0.0	—	—	0.0	0.0
2	»	»	1.0	—	—	0.0	—	—	0.0	0.0
3	»	»	1.0	0.2	—	0.3	—	—	0.7	1.2
4	»	»	1.0	0.2	—	0.3	—	—	0.5	0.9
5	»	»	1.0	—	0.2	0.1	—	—	0.2	0.8
6	»	»	1.0	—	0.2	0.1	—	—	0.2	0.6
IV. 1	8. 2. 08	aus Berliner Hefe	—	—	—	6	14	—	33	35
2	»	»	1.0	—	—	0.8	3	—	18	20
3	»	»	1.0	0.2	—	5	8	—	23	24
4	»	»	1.0	0.2	—	5	8	—	20	21
5	»	»	1.0	—	0.2	2	6	—	28	32
6	»	»	1.0	—	0.2	3	6	—	25	30