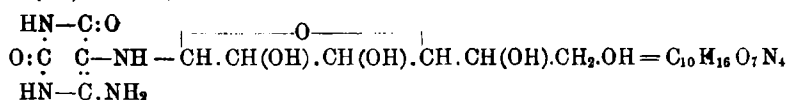


lumens eingeengt und dann im Föhnwind bei ca. 45° fast völlig abgedampft. Der orangefarbene Rückstand, der undeutlich krystallisiert ist, wird mit viel kaltem Wasser zur Lösung des überschüssigen Zuckers versetzt und abfiltriert. Er wird mit Sprit und Äther nachgewaschen und aus 30-prozentiger, siedender Traubenzucker-Lösung umkrystallisiert. Man behandelt zuerst mit wenig Zuckerlösung, wodurch viel Verunreinigung in Lösung geht. Aus den rasch abgekühlten Zuckerlösungen fällt allmählich reichlich hellgelbes Krystallinat, das aus kleinen Nadelchen besteht. Nach zweimaligem Umkrystallisieren wird die Substanz analysiert. Bei langsamem Erhitzen schmilzt die Substanz unter Zersetzung bei 186—187° zu einer tiefbraunen Flüssigkeit; bei raschem Erhitzen liegt der Schmelzpunkt bei 205—206°. Mit konzentrierter Salpetersäure gibt die Substanz keine Farbenreaktion.

0.0660 g Sbst.: 0.0965 g CO₂, 0.0327 g H₂O. — 0.1103 g Sbst.: 19.1 ccm N (16°, 703 mm).



Ber. C 39.47, H 5.26, N 18.42.

Gef. » 39.87, » 5.50, » 18.86.

Durch Kochen mit Wasser wird der Pyrimidin-zucker zersetzt. Das Zersetzungsprodukt wird untersucht.

Wir haben auch mit andren Pyrimidinbasen Zucker in Reaktion gebracht; doch soll die Veröffentlichung des Materials später erfolgen.

192. C. Neuberg und Joh. Kerb: Über Gärungen in der 3-Kohlenstoff-Reihe.

(Eingegangen am 8. April 1914.)

In einer Serie von Mitteilungen haben Neuberg und Mitarbeiter¹⁾ den Verlauf der Vergärung von Brenztraubensäure durch Hefen und Hefenpräparate klargelegt und die Beziehungen dieser Reaktion zur alkoholischen Gärung des Zuckers erörtert. Dabei zeigte sich, daß eine Reihe von Nichtzuckerstoffen von Hefen angegriffen wird (zuckerfreie Gärungen), und daß dieser Vorgang in bestimmten Fällen auf

¹⁾ Literatur über die Arbeiten aus den Jahren 1910—1913 in C. Neuberg: »Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle«, Monogr. Jena 1913, sowie Mitteilungen I—XVI in der Bio. Z. 1911—1914.

die Wirkung eines besonderen Fermentes, der Carboxylase, zurückgeführt werden kann. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Untersuchungen liegen in der Erkenntnis, daß Kohlendioxyd aus Säuren durch Fermente des Zymase-Komplexes losgelöst werden kann, und daß eben diese Säuren in einer verständlichen Beziehung zum Molekül der vergärbaren Zuckerarten stehen.

Gleich bei unsern orientierenden Versuchen, die zur Auffindung der zuckerfreien Gärungen geführt haben, sind besonders die Substanzen der 3-Kohlenstoff-Reihe in Betracht gezogen worden, so die Brenztraubensäure¹⁾, die Glycerinsäure²⁾ und die Oxy-glycerinsäure³⁾. Den quantitativ augenfälligsten Umfang besitzt die zuckerfreie Gärung der Brenztraubensäure, und dieser Umstand ist die Veranlassung gewesen, zunächst die neue Erscheinung vornehmlich an dieser Substanz möglichst gründlich zu studieren.

Immerhin haben uns die Aufklärungen des Reaktionsverlaufes, die Beibringung von Beweisen für den enzymatischen Charakter der Reaktion und eingehende Studien über das Verhalten des neuen Fermentes (der Carboxylase) in den verschiedensten Hefen und Hefepräparaten jahrelang in Anspruch genommen. Wenn sich auch niemand mehr als wir über Arbeiten auf dem Gebiete der zuckerfreien Hefegärungen freuen kann, so müssen wir doch Widerspruch erheben gegen die Darstellung, die jüngst A. v. Lebedew von demselben Gegenstand unter dem Titel »Zellenfreie Gärung der Polyoxycarbon-säuren« gibt⁴⁾. Zunächst möchten wir betonen, daß wir die »Gärung« der Glycerinsäure, sowie auch der Gluconsäure mit verschiedenen Hefen zahlenmäßig längst⁵⁾ beschrieben und auch für den enzymatischen Charakter der Reaktion durch Versuche mit Aceton-Dauerhefe Anhaltspunkte gewonnen hatten.

In der Charakterisierung eines Produktes, das neben Kohlensäure bei der Einwirkung von Trockenhefe auf Glycerinsäure-Lösung entsteht, ist uns v. Lebedew zuvorgekommen. Er benutzt für die Aufarbeitung des Gärgutes dieselbe Methodik, wie wir sie bei der Brenztraubensäure-Gärung angewendet haben, und bezeichnet, allerdings ohne Ausführung einer Analyse, das Reaktionsprodukt als Acetaldehyd. Diesen Schluß können wir durchaus bestätigen, wie folgende Versuche zeigen.

¹⁾ s. Anm. 1 zu S. 1308.

²⁾ C. Neuberg, A. Hildesheimer u. L. Tir, Bio. Z. 31, 176; 32, 325, [1911.]

³⁾ C. Neuberg und J. Kerb, Bio. Z. 53, 416, [1913]; C. Neuberg und P. Rosenthal, Bio. Z. 61, 171, [1914].

⁴⁾ B. 47, 660, 965 [1914]. ⁵⁾ l. c. Bio. Z. 31 und 32, [1911].

Versuche 1—4.

1. In eine Suspension von 250 g Trockenhefe (Schroder) in 2500 ccm Wasser wurden 10 ccm Glycerinsäure (entsprechend 8.8 g reiner Säure) gegeben. Nach 40-stündiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur unter den bei uns früher bei der Brenztraubensäure-Gärung beobachteten Kautelen wurde 1 l. mit Dampf unter sorgfältigster Kühlung abgetrieben. Durch erneute Destillation wurde dieses Destillat auf 330 ccm gebracht. Es gab starke Reaktion nach Rimini und lieferte bei Behandlung mit essigsaurem *p*-Nitrophenylhydrazin sofort einen Niederschlag von Acetaldehyd-*p*-nitrophenylhydrazon. Nach Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol betrug die Menge 1.20 g, entsprechend rund 0.3 g Acetaldehyd. Schmp. 127—128°.

0.1344 g Sbst.: 28.9 ccm N (22°, 744 mm).

$C_8H_9N_3O_2$. Ber. N 23.46. Gef. N 23.90.

2. Genau der gleiche Versuch wurde mit denselben Quantitäten Hefe und Wasser, aber ohne Glycerinsäure angesetzt und durchgeführt. Das Enddestillat gab nur schwache Reaktion nach Rimini und eine unbedeutende Fällung mit *p*-Nitrophenylhydrazin.

3. 250 g Trockenhefe, 2500 ccm Wasser, 8.8 g Glycerinsäure wurden 64 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Im Destillat wurde hier der Aldehyd titrimetrisch nach Ripper und der Alkohol nach Nicloux ermittelt. Gefunden wurden 0.330 g Acetaldehyd und 5.76 g Alkohol.

4. 250 g Hefe + 2500 g Wasser lieferten unter genau denselben Bedingungen keine nennenswerten Mengen Aldehyd und 3.36 g Alkohol.

Das Plus an Alkohol gegen Versuch 3 beziffert sich also auf 2.4 g.

Nicht übereinstimmen können wir jedoch mit v. Lebedew über die Bedeutung der Glycerinsäure-Gärung. Denn mit lebenden Reinzuchthefen (3 obergärigen und 2 untergärigen) haben wir keine regelmäßige »Vergärung« der Glycerinsäure beobachten können.

Aus einer großen Zahl alter und neuer Versuche teilen wir im Auszuge folgende mit.

Versuch 5.

Zur Untersuchung dienten 1-proz. Lösungen der Glycerinsäure in Leitungswasser. Für die vergleichenden Versuche benutzten wir Schröttersche Gärröhrchen. Auf je 20 ccm Flüssigkeit kamen 2.0 g der betr. Reinzuchtheife. Gärdauer 24 Stunden im Brutschrank.

Hefen- rasse	ccm CO ₂ aus einer 1-proz. Lösung von Glycerinsäure	ccm CO ₂ allein aus Hefe und Wasser
II	0	0
XII	0.5	0.5
M	4.5	1
K	4.5	3
U	2	2.5

Versuch 6.

Verwendet wurde eine 0.5-proz. Glycerinlösung. Im übrigen wurde der Versuch wie Nr. 5 ausgeführt, jedoch auf 48 Stunden ausgedehnt.

Hefen- rasse	ccm CO ₂ aus einer 0.5-proz. Lösung von Glycerinsäure	ccm CO ₂ allein aus Hefe und Wasser
II	0.5	2.5
XII	0.5	1.5
M	3.5	Spur
K	5	6
U	2.5	2

Diese Versuche mit lebenden Hefen zeigen sogar in einigen Fällen eine auffallende Hemmung der Selbstgärung durch freie Glycerinsäure.

Da wir diese Erscheinung auch bei anderen zahlreichen Versuchen in Eudiometern und Schrötterschen Gärröhrchen beobachtet haben, kann sie kaum zufällig sein. Wir sind deshalb dazu übergegangen, an Stelle der freien Glycerinsäure ihr reines Calciumsalz zu verwenden, das nebenbei den Vorzug der Einheitlichkeit vor der in gewöhnlicher Weise bereiteten sirupösen Glycerinsäure besitzt. Wir haben im Anschluß an unsere früheren Versuche das Calciumglycerinat mit Borsäure gepuffert, um einer Zurückhaltung von Kohlensäure vorzubeugen.

Versuch 7.

Hierzu diente eine Lösung, die 0.72 g glycerinsaures Calcium + 0.15 g Borsäure in 100 ccm Wasser enthält. Für die Kontrollen wurde eine Flüssigkeit benutzt, die 1.4 g CaO und 1.55 g Borsäure in 1000 ccm H₂O enthält.

Hefen- rasse	ccm CO ₂ aus der Glycerinat- Lösung nach				ccm CO ₂ aus der Kontrolle nach			
	4 Stdn.	24 Stdn.	32 Stdn.	48 Stdn.	4 Stdn.	24 Stdn.	32 Stdn.	48 Stdn.
II	0	0	0	0	1	1	1	1
M	0	0	0	10 ¹⁾	0	1.3	3 ¹⁾	10 ¹⁾
U	0	0	0	0	1	1	1	1

Obleich Zucker sowie Brenztraubensäure bekanntlich in wenigen Stunden vergären, haben wir eine neue Reihe vergleichender

¹⁾ Beim Aufbewahren war hier Bakterien-Entwicklung eingetreten. Das gebildete Gas war nur etwa zur Hälfte durch KOH absorbierbar.

Untersuchungen mit Rohrzucker, Brenztraubensäure, Glycerinsäure und einer scheinbar indifferenten Säure, der Essigsäure, angestellt und Kontrollen mit Hefen und Wasser (hier stets 2 g Hefe auf 20 ccm Flüssigkeit) vorgenommen. Verwendet sind überall 1-proz. Lösungen. Das sehr instructive Ergebnis geben die folgenden Tabellen wieder.

Versuch 8.

Heferasse II	ccm CO ₂ nach						
	1.5 Std.	4 Std.	6.5 Std.	21 Std.	25 Std.	45 Std.	50 Std.
Zucker	8	10	10	10	11	11	11
Brenztraubensäure	7	7.5	9.5	10	11	11	11
Glycerinsäure	0	0	0	0	0	0	0
Essigsäure	0	0	0.2	0.2	0.2	0.5	0.5
H ₂ O	0	0	0	0	0	0.8	1.0

Versuch 9.

Heferasse M	ccm CO ₂ nach						
	1.5 Std.	4 Std.	6.5 Std.	21 Std.	25 Std.	45 Std.	50 Std.
Zucker	9	10	11	11	11	11	11
Brenztraubensäure	5	8	9	11	11	11	11
Glycerinsäure	0	0	0	0	0	0	Spur
Essigsäure	0	0	0	0	0	0	0
Wasser	0.5	0.5	0.8	1	1	1.3	1.3

Versuch 10.

Heferasse U	ccm CO ₂ nach						
	1.5 Std.	4 Std.	6.5 Std.	21 Std.	25 Std.	45 Std.	50 Std.
Zucker	7	9	9	11	11	11	11
Brenztraubensäure	4	8.5	9	11	11	11	11
Glycerinsäure	0	0	0	0	0	0	0
Essigsäure	Spur	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Wasser	0	0	0	Spur	Spur	Spur	0.8

Auch diese Versuche zeigen eine Gärungsfähigkeit der Glycerinsäure mit unseren frischen Hefen unter Bedingungen, wo Zucker oder Brenztraubensäure glatt vergoren werden. Es ist also schwer zu erklären, wieso ein angeblich zwischen Zucker und Brenztraubensäure

stehendes Produkt sich als gärunfähig unter den verschiedensten Verhältnissen erweist, wo die genannten wirklich vergärbaren Substanzen mit großer Vehemenz umgesetzt werden. Außerdem sollte man zunächst erwarten, daß ein Zwischenprodukt der normalen Zuckergärung mindestens so schnell wie der Zucker selbst vergärt. Nach Lebedew's eigenen Angaben und unseren Erfahrungen, soweit wir eine »Vergärbarkeit« haben nachweisen können, ist dagegen die Vergärung der Glycerinsäure bedeutend langsamer. Hingegen ist für die Brenztraubensäure die Vergärbarkeit mit einer theoretisch vorauszusehenden Schnelligkeit festgestellt¹⁾.

Es braucht nicht diskutiert zu werden, daß die Gärung mit lebenden Hefezellen den normalen Vorgang darstellt.

Mit einer Angreifbarkeit der Glycerinsäure durch leblose Hefe muß es also eine besondere Bewandnis haben, über die erst weitere Versuche Aufklärung geben können. Da insbesondere die Trockenhefe nach von Lebedew meist sehr reich an Glykogen ist, haben wir hier an eine Stimulierung der Selbstgärung denken müssen, und daß man eine solche Einwirkung namentlich bei Trockenhefen nicht außer acht lassen darf, zeigen die folgenden Versuche mit Essigsäure.

Versuch 11—14.

11) Die Suspension von 250 g Trockenhefe in 2500 ccm Leitungswasser wurde 46 Stunden bei Zimmertemperatur digeriert.

12) Der gleiche Ansatz unter Zugabe von 10 ccm Eisessig.

13) } Wiederholung von 11) und 12).
14) }

Nach 46 Stunden wurde von jedem Ansatz 1 l abdestilliert und das Destillat auf 400 ccm gebracht.

Gefunden wurden:

Aldehyd (nach Ripper) in 11) und 13): Spuren,
in 12): 0.055 g, in 14): 0.046 g.

Alkohol (nach Nieloux) in 11): 3.36 g, in 13): 3.38 g,
in 14): 3.80 g.

Da man kaum die vermehrte Bildung von Aldehyd und Alkohol auf Kosten der Essigsäure setzen kann, so wird man die Selbstgärung dafür verantwortlich machen müssen. Vielleicht darf man den hohen Bakteriengehalt der Trockenhefe, über den wir an anderer Stelle berichten, für die Selbstverzuckerung mit in Betracht ziehen. Wir möchten darauf aufmerksam machen, daß mit den käuflichen Präparaten nur sehr schwer völlig sterile Versuche durchgeführt werden können, viel schwerer als mit frischen Reinzuchthefen. Auf die bakterielle Infektion ist wohl auch der hohe Grad der Säuerung

¹⁾ C. Neuberg und Joh. Kerb, Bio. Z. 53, 406 [1913].

zurückzuführen, den Aufschwemmungen dieser Trockenhefe in Wasser nach der Digestion aufweisen. (Vergl. Versuch 15.)

Da infolge eines Einflusses der Glycerinsäure auf die Selbstgärung eine Ermittlung der Kohlensäure kein richtiges Bild von dem Umfange der »Glycerinsäure-Gärung« gibt, haben wir einen ungefähren Anhaltspunkt durch Titration der Säure vor und nach der Vergärung zu gewinnen gesucht:

Versuch 15.

α) 25 g Trockenhefe, 250 ccm Wasser und 0.88 g Glycerinsäure wurden 24 Stunden bei Zimmertemperatur belassen.

β) 25 g Trockenhefe + 250 ccm Wasser wurden 10 Minuten gekocht, dann mit 0.88 g Glycerinsäure versetzt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

γ) 25 g Trockenhefe + 250 ccm Wasser wurden ohne Zusatz 24 Stdn. belassen.

Nach dieser Zeit wurden alle Flüssigkeiten zur Austreibung flüchtiger Säuren gleichmäßig 1 Stunde lang im Dampfstrom destilliert. Der Rückstand wurde auf 400 ccm gebracht, und bei einem aliquoten Teil des klaren Filtrats die titrierbare Säure ermittelt.

α) verbrauchte 52 ccm $\frac{1}{5}$ -KOH,

β) » 60 » » ,

γ) » 31 » » .

Die Abnahme der titrierbaren Säure durch den Gärakt war also gering.

Daß aber auch bei der Autodigestion von Trockenhefe und Macerationssaft nicht unbeträchtliche Mengen von Acetaldehyd und wohl auch von Alkohol sich bilden können, haben wir früher dargetan¹⁾.

Das Wesen der »Glycerinsäure-Gärung«²⁾ ist also noch keineswegs geklärt, und es scheint uns zum mindesten verfrüht, so weitgehende Schlußfolgerungen daraus zu ziehen, wie es von Lebedew tut. Ganz besonders aber müssen wir Verwahrung gegen den Anspruch Lebedews einlegen, daß das eigentliche Gärungsproblem, soweit es in der Herleitung der Gruppe $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2$ — aus den Zuckerresten besteht, erst durch seine jüngste Ausführung gefördert worden ist. Recht ähnliche Betrachtungen haben wir in zahlreichen Mitteilungen seit Jahren in

¹⁾ Bio. Z. 43, 494 [1912]; 58, 158 [1913].

²⁾ Außer bei der Brenztraubensäure, deren Gärung ohne Zweifel ist, haben wir bei allen übrigen Substanzen uns über die Art der Angreifbarkeit stets mit Reserve geäußert und besonders betont, daß sie keineswegs mit der alkoholischen Gärung zu vergleichen sei (vergl. Bio. Z. 32, 323 [1911]). Unberechtigt ist die Behauptung Lebedews, daß Hefe Milchsäure nicht angreife; denn auch das Verschwinden zugesetzter Milchsäure, das Buchner und Meisenheimer (B. 37, 417 [1904]; 38, 620 [1905]; 39, 3201 [1906]) beschreiben, zeigt das Gegenteil!

den Vordergrund gestellt! Zunächst scheint auch das wasserabspaltende Ferment, die »Dehydratase«, ein wenig in der Luft zu schweben. Denn schreibt man die Brenztraubensäure als Hydrat¹⁾, $\text{CH}_2 \cdot \text{C}(\text{OH})_2 \cdot \text{COOH}$, so sieht man, daß es sich auch bei einer Herleitung aus der Glycerinsäure überhaupt nicht um eine Wasserabspaltung handelt, sondern lediglich um eine H—OH-Verschiebung, mit welcher bei den Gärungsvorgängen von jeher gerechnet worden ist.

Die eigentliche Wasserabspaltung würde sich dann überhaupt erst beim Zerfall des Brenztraubensäure- bzw. des Acetaldehyd-hydrats vollziehen. Wir haben übrigens auch Versuche darüber angestellt, ob ein wirkliches Anhydrid der Glycerinsäure, die Glycidsäure, $\text{COOH} \cdot \text{CH} \cdot \text{CH}_2$, gärbar ist, bisher aber widersprechende Resultate

O

dabei erhalten; doch möchten wir uns die Untersuchung dieser Epihydrinsäure und ihrer Homologen auf Gärbarkeit vorbehalten. Was schließlich die Möglichkeit des Zusammenhanges von Glycerinsäure mit Brenztraubensäure anlangt, so bemerken wir, daß wir ihn an vielen Stellen unserer früheren Arbeiten²⁾ mit nahezu den gleichen Formelbildern, wie jetzt v. Lebedew, dargelegt haben.

Gerade in Rücksicht auf Lebedews frühere Angabe³⁾, daß Methylglyoxal gäre, haben wir die etwaige Wasserabspaltung in die Phase der Methylglyoxal-Bildung verlegt. Und wenn Lebedew nunmehr⁴⁾ die Gärbarkeit des Methylglyoxals widerrufen, scheint es ungerecht, uns die Bezugnahme auf seine frühere, sehr bestimmte, positive Behauptung zum Vorwurf zu machen. Daß übrigens auch die Glycerinsäure selbst als Zwischenprodukt längst in Betracht gezogen worden ist, geht außer aus unseren eigenen Arbeiten aus den Ausführungen von Carl Oppenheimer⁵⁾ hervor.

¹⁾ Daß unter den natürlichen Verhältnissen überhaupt wohl die Hydrate solcher Carbonylverbindungen in Reaktion treten, haben wir mehrfach betont unter gleichzeitigem Hinweis, daß der Übersichtlichkeit wegen von uns die Formeln für wasserfreie Substanz gebraucht werden (vergl. Monogr. S. 7).

²⁾ Z. B. Bio. Z. 47, 406 [1912]; 51, 496 [1913]; 53, 410 [1913]; Monographie S. 4 und a. a. O.

³⁾ A. v. Lebedew u. N. Griaznoff, B. 45, 3268 [1912]. Seine Angabe lautet hier: »Nach den orientierenden Versuchen von Lebedew ist Methylglyoxal durch Hefe-Macerationssaft vergärbar, worüber später von mir ausführlicher berichtet wird.«

⁴⁾ B. 47, 660 [1914].

⁵⁾ C. Oppenheimer, Fermente, IV. Auflage, S. 696 [1913].