

Die hinterbleibende schwefelsaure Lösung wird mit Natronlauge übersättigt und mit Dampf destilliert. Das übergehende Öl läßt sich mit Hilfe des Pikrats leicht als Monomethyl-anilin (0.5—1 g) identifizieren.

Der nach der Dampfdestillation zurückbleibende Anteil wird sofort heiß filtriert, wobei nur eine geringe Menge eines schwarzen Niederschlags auf dem Filter verbleibt, und das Filtrat durch Einleiten von Kohlensäure gefällt. Ohne den entstandenen Niederschlag abzufiltrieren, äthert man wiederholt aus, trocknet die Ätherlösung mit Natriumsulfat, kocht mit Tierkohle und destilliert dann den Äther ab. Das hinterbleibende bräunliche Öl erstarrt rasch zu Krystallen. Durch Umkrystallisieren aus Benzol gewinnt man hellgelbe Nadeln, die bei 87° schmelzen, wie es für *p*-Methylamino-phenol angegeben¹⁾ ist.

Die oben beschriebenen Versuche sind von Herrn Dr. Hartmann ausgeführt worden, dem ich für seine eifrige Unterstützung meinen besten Dank ausspreche.

185. Carl Neuberg und Elsa Reinfurth Weitere Untersuchungen über die korrelative Bildung von Acetaldehyd und Glycerin bei der Zuckerspaltung und neue Beiträge zur Theorie der alkoholischen Gärung.

[Aus der Chemischen Abteilung des Kaiser-Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.]

(Eingegangen am 13. August 1919.)

Auf Grund der Erkenntnis, daß Brenztraubensäure mit besonderer Leichtigkeit von Hefe und ihren Zubereitungen (zellfreien Säften sowie Trocken- und Dauerpräparaten) in Gärung versetzt wird und dabei durch ein in den Mikroorganismen enthaltenes und von ihnen abtrennbares Ferment, die Carboxylase, in Acetaldehyd und Kohlendioxyd zerlegt wird, haben C. Neuberg und J. Kerb²⁾ im Jahre 1913 eine neue Theorie der alkoholischen Gärung entwickelt, welche der Brenztraubensäure bzw. dem Acetaldehyd eine zentrale Stellung zuweist.

Neben vielen anderen Punkten diente zur Stütze dieser Anschauung die Beobachtung, daß die Brenztraubensäure-Gärung so geleitet werden kann,

¹⁾ Lumière und Seyewetz, Bl. [3] 35, 1206 [1906].

²⁾ C. Neuberg und J. Kerb, Bio. Z. 58, 158 [1913]; C. Neuberg, Monogr. »Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle«, Jena 1913.

daß sie Äthylalkohol liefert¹⁾. Dies war im besonderen Grade der Fall, wenn die Hefe auf ein äquimolekulares Gemisch von Brenztraubensäure und Glycerin einwirkte; zwar ist der Mechanismus dieses Vorganges nicht ganz aufgeklärt, doch sind die Beziehungen des Glycerins zur Brenztraubensäure oder zu ihren biologischen Spaltungsprodukten, Acetaldehyd und Kohlendioxyd, schon frühzeitig erkannt worden²⁾. Das Brenztraubensäure zersetzende Ferment, die Carboxylase, nimmt einen Sonderplatz unter allen sonst bekannten Enzymen ein. Alle übrigen spaltenden Fermente lösen entweder Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen, wie die Esterasen und Glucosidasen, oder Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen, wie die große Gruppe der eiweiß-abbauenden Fermente und Amidasen. Eine Zerreiung einer wirklichen Kohlenstoff-Kette erfolgt allein bei den Garungsvorgangen, und der einfachste Fall dieser Art liegt bei der Carboxylase vor. Sie trennt mit groter Leichtigkeit eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung in der Brenztraubensäure, die sonst dieser Spaltung ganz bedeutenden Widerstand entgegensetzt, beispielsweise erst unter Druck durch Schwefelsäure bei 150°, und auch dann keineswegs glatt, in Acetaldehyd und Kohlendioxyd zersetzt wird. Von den mannigfachen anderen Gründen, die sich für die allgemeine Bedeutung der Carboxylase in der Natur ergeben haben, sei hier allein die Tatsache angeführt, da das Ferment überall dort nachweisbar ist, wo zymase-artige Wirkungen in Erscheinung treten. Somit kann die Carboxylase als ein Teilferment des nicht einheitlichen Zymase-Komplexes gelten. Durch ausgedehnte Untersuchungen über die sogenannten phytochemischen Reduktionen haben dann Neuberg und Mitarbeiter (1912—1918) bewiesen, da zugefügte Aldehyde von der Hefe leicht in die entsprechenden Alkohole übergeführt werden. Damit waren alle experimentellen Grundlagen für die Berechtigung der Anschauung erbracht, da die Schluphasen des Garaktes darin bestehen, da Brenztraubensäure unter der Einwirkung von Carboxylase in Kohlendioxyd und Acetaldehyd zerfällt, und da die im letzteren präformierte Aethylgruppe durch eine anschließende Reduktion den Weingeist ergibt. Ungeklärt sind dagegen die Vorgänge, welche aus der C₆- in die C₂-Reihe führen. Wir stützen uns auf die bisher annehmbarste, von A. Wohl³⁾ entwickelte Vorstellung, die das Methylglyoxal als Zwischenstufe heranzieht. Der Umstand, da ein Methylglyoxal bisher nicht garbar befunden ist, kann nicht ernstlich gegen die Methylglyoxal-Hypothese geltend gemacht werden; denn mehrfach konnten wir darauf hinweisen, da von den zahlreich möglichen Formen des Methylglyoxals — es sind 22 und mehr denkbar⁴⁾ — ja nur eine einzige bekannt ist. Dieses gewöhnlich durch den Ausdruck CH₃.CO.CHO bezeichnete Isomere mu aber, da es vermutlich das stabilste ist, gerade am ungeeignetsten für die Prüfung hinsichtlich der Vergärbarkeit erscheinen. Da dem Methylglyoxal zweifelsohne eine biologische Bedeutung zukommt, folgt auch daraus,

¹⁾ C. Neuberg und J. Kerb, B. 46, 2225 [1913].

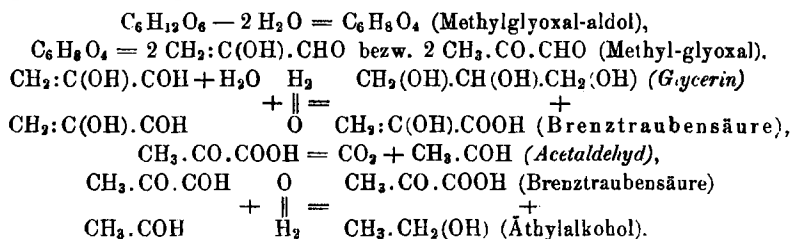
²⁾ C. Neuberg und J. Kerb, Z. f. Garungsphysiologie, 1, 114 [1912].

³⁾ A. Wohl, Bio. Z. 5, 54 [1907].

⁴⁾ C. Neuberg und J. Hirsch, Bio. Z. 96, 175 [1919].

daß jene allein zugängliche Form von einem Enzym in Milchsäure umgewandelt wird¹⁾, und zwar mittels einer Art von innerer Cannizzaroscher Reaktion. Schließlich ist das Methyl-glyoxal ja nichts anderes als der zur Brenztraubensäure gehörige Aldehyd.

Alle diese Beziehungen kommen in dem von Neuberg und Kerb aufgestellten Gärungsschema zum Ausdruck:



Demzufolge sind Methyl-glyoxal und Brenztraubensäure ständige Zwischenstufen und Acetaldehyd sowie Glycerin notwendige Nebenprodukte der Hefen-Gärung. Tatsächlich werden Acetaldehyd und in etwas größerer Menge Glycerin stets bei der alkoholischen Zuckerspaltung beobachtet.

Eine Berechtigung für die Annahme einer intermediären Entstehung von Brenztraubensäure, welche in letzter Linie ja die korrelative Bildung von Acetaldehyd und Glycerin bedingt, scheint nun auch darin gegeben, daß der Brenztraubensäurealdehyd auf rein chemischem Wege als Spaltungsprodukt des Zuckers erhalten werden kann. Man bedarf dazu nicht des hierfür von G. Pinkus zuerst benutzten starken Ätzalkalis, sondern es genügt²⁾ eine Digestion des Zuckers mit ganz schwach alkalisch reagierenden Stoffen, wie mit den Phosphaten, Boraten, Sulfiten, Carbonaten und Bicarbonaten der Alkalien oder mit verdünntem Ammoniak.

Diese Feststellungen eröffneten den Weg, durch Zugabe der gleichen alkalisch reagierenden Salze zu gärenden Kohlenhydratlösungen am Vorgange der alkoholischen Zuckerspaltung experimentelle Veränderungen hervorzurufen, die das obige Schema der Gärung zu stützen vermochten. Zwar war es zunächst als ein kühnes Unterfangen erschienen, die normalerweise stets bei saurer Reaktion sich abspielende alkoholische Gärung in einem alkalischen Milieu erzwingen zu wollen. Doch hatte schon der allem Anscheine nach früher nie angestellte Versuch³⁾ gelehrt, daß selbst das von der lebenden Hefezelle abgetrennte

¹⁾ C. Neuberg, Bio. Z. 49, 502; 51, 484; 55, 501 [1913]; H. D. Dakin und H. W. Dudley, Journ. of Biolog. Chem. 14, 157 [1913].

²⁾ C. Neuberg und W. Örtel, Bio. Z. 55, 495 [1913]; C. Neuberg und B. Rewald, Bio. Z. 71, 144 [1915].

³⁾ C. Neuberg, Bio. Z. 71, 51 und 57 [1915].

Gärungsferment, d. h. die Zymase der Hefensäfte, eine längere Berührung mit Lauge sowie mit anderen Alkalien ertrug, ohne unwirksam zu werden.

Schritt um Schritt konnten alsdann Beweisstücke für die genannte Theorie erbracht werden. Zunächst zeigten im Jahre 1916 C. Neuberg und E. Färber¹⁾, daß alle die genannten alkalisch reagierenden Substanzen, die unter dem Namen »Alkalisatoren« zusammengefaßt wurden, die Gärung nicht unterdrücken, aber eine charakteristische Verschiebung in den Endprodukten herbeiführen. Abgesehen von Einblicken in den Mechanismus des Gäraktes hatte sich als erste wichtige Folgerung¹⁾ ergeben, daß die beiden Nebenerzeugnisse der normalen Gärung, Acetaldehyd und Glycerin, unter dem Einflusse der Zusätze zu Hauptprodukten werden. Da sie aus dem Zucker auf Kosten der gewöhnlichen Spaltungsstücke Äthylalkohol und Kohlendioxyd entstehen, nimmt die Menge der letzteren entsprechend ab.

Bereits bei ihren Untersuchungen über die alkalische Gärung mit zellfreiem Material, mit den Hefensäften, hatten Neuberg und Färber einen deutlichen Unterschied in der Wirkungsweise der einzelnen Zusätze (l. c. S. 247) konstatiert; die Sulfite nahmen eine Sonderstellung ein. Dieser Punkt hat seine Klärung durch unsere frühere Mitteilung über diesen Gegenstand²⁾ erfahren. Wir haben gezeigt, daß die neutralen schwefligsauren Salze dadurch eine spezifische Leistung entfalten, daß sie eine chemische Verbindung mit dem bei der biologischen Zuckerspaltung intermediär auftretenden Acetaldehyd eingehen. In Form des bekannten acetaldehyd-schwefligsauren Salzes häuft sich diese Zwischenstufe in gewaltigen Mengen, bis zu mehr als 70 % der theoretischen Möglichkeit, im Gärgut an; die Doppelverbindung konnte daraus auch in Substanz isoliert werden. Damit war glücklich ein altes Problem der Gärungsforschung der Lösung zugeführt: Die Abfangung einer Zwischenstufe.

Die sich aufdrängende Frage, warum gerade der Acetaldehyd und nicht ein ihm vorangehendes carbonylhaltiges Zwischengebilde, z. B. die Brenztraubensäure, durch das Fixationsmittel festgehalten wird, fand ihre experimentelle Beantwortung. Das Anlagerungsprodukt der Sulfite an die Brenztraubensäure wird nämlich durch die Carboxylase in Kohlendioxyd und acetaldehyd-schwefligsaures Salz gespalten. Die Zerfallskonstante wird bei den hier in Betracht kommenden Komplexen mit sinkendem Molekulargewicht kleiner. Die Glucose-Verbindung ist in verdünnten Lösungen nahezu vollständig in ihre

¹⁾ C. Neuberg und E. Färber, Bio. Z. 78, 238 [1916].

²⁾ C. Neuberg und E. Reinfurth, Bio. Z. 89, 365 [1918].

Bestandteile dissoziiert, während das Acetaldehyd-sulfit außerordentlich beständig ist und nur von der formaldehyd-schwelligen Säure an Widerstandskraft übertroffen wird.

Der dem Abfangverfahren zugrunde liegende experimentelle Eingriff macht also den Acetaldehyd zu einem Hauptprodukt der Gärung. Durch die Blockierung des Acetaldehyds, d. h. durch seine Überführung in die Verbindung mit Sulfit, die offenbar so fest ist, daß sie von den biologischen Agenzien nicht gelockert werden kann, wird der letzte Akt des Gärungsvorganges — die Hydrierung des Acetaldehyds zum Äthylalkohol — vereitelt. Demgemäß wird die normalerweise gegen den Acetaldehyd gerichtete Reduktionsleistung auf einen anderen Weg verwiesen. Eine Entwicklung freien Wasserstoffs findet nicht statt, das Gärungsgas ist ausschließlich Kohlensäure. Eine Reduktion des Kohlendioxyds etwa im Entstehungszustande zu Ameisensäure, Formaldehyd, Oxalsäure usw. erfolgt nicht. Auch jede Veränderung¹⁾ des als Abfangmittel zugefügten Sulfites unterbleibt. Demgemäß muß der verfügbar gewordene »Gärungs-Wasserstoff« in anderer Weise die Betätigung seiner Affinitäten erstreben. Da nun keine Reduktion an den niederen Zerfallsprodukten nachweisbar war, so mußte der Hydrierungsvorgang an einer Zwischenstufe einsetzen, die vor der Auflösung der 3-Kohlenstoff-Kette in Substanzen der C₂- und C₁-Reihe auftritt. Ein Blick auf das zugrunde gelegte Gärungsschema wies die Richtung und führte uns zu der Erkenntnis, über die wir in unserer weiteren Mitteilung²⁾ berichtet hatten. Glycerin ist das einzige von jener Theorie noch vorgesehene Hydrierungsprodukt. Glycerin ist das Reduktionsäquivalent für die Brenztraubensäure, die in Kohlensäure und Acetaldehyd zerfällt. Unterbleibt die Reduktion des letzteren, so besteht als alleinige Ausgleichsmöglichkeit die vermehrte und korrelative Bildung von Glycerin.

Losgelöst von jeder Hypothese besagt dieses Ergebnis, daß dem Oxydationsprodukt Acetaldehyd das Reduktionserzeugnis Glycerin entsprechen muß. Ein scharfer Beweis für diese Beziehung liegt, wie wir früher ausführlich dargelegt haben, in der ausgesprochenen Abhängigkeit der Ausbeute an Acetaldehyd und Glycerin von der Menge des Abfangmittels. Wir führen zum Beleg aus unseren vorerwähnten Mitteilungen die folgende Übersicht an:

¹⁾ Abgesehen von der teilweisen Anlagerung an den Acetaldehyd sowie einer geringfügigen unspezifischen Oxydation zu Sulfat.

²⁾ C. Neuberg und E. Reinfurth, Bio. Z. 92, 234 [1918].

33 g	Na ₂ SO ₃	auf 100 g	Rohrzucker	erg.	11.90 g	Acetaldehyd	u.	23.37 g	Glycerin,
50 »	»	»	»	»	»	12.52 »	»	»	24.86 »
75 »	»	»	»	»	»	13.89 »	»	»	27.61 »
150 »	»	»	»	»	»	18.65 »	»	»	36.90 »

Bei jeder Sulfit-Konzentration entfällt auf 1 Mol. fixierten Acetaldehyds 1 Mol. Glycerin; da das Molekulargewicht des Acetaldehyds (44) rund halb so groß ist als das des Glycerins (92), so ist die erhaltene Glycerinmenge stets rund doppelt so groß wie die Aldehydausbeute. Unter Berücksichtigung der unvermeidlichen Analysenfehler bei den nicht ganz einfachen Bestimmungen von Aldehyd und Glycerin tritt diese Abhängigkeit der beiden Stoffe von einander auch in der obigen kleinen Tabelle auf das deutlichste zu Tage.

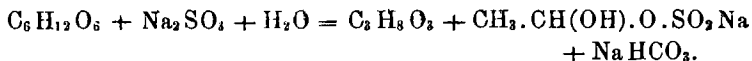
Die als Ausgangsmaterial angewendete Zuckerart war ohne wesentlichen Einfluß auf das Resultat. Traubenzucker und Fruchtzucker lieferten denselben Ertrag, und auch Rohrzucker konnte mit gleichem Erfolge benutzt werden. Denn wir selbst sowie zuvor Neuberg und Färber (l. c.) hatten bereits dargetan, daß die Hefen-Invertase bei der alkalischen Reaktion des Gärortes so wirksam ist, daß vollständige Vergärung der Saccharose erfolgt.

Zum ersten Mal war auf diese Art eine experimentelle Abänderung des Gärungsquotienten herbeigeführt worden. Normalerweise waltet das Verhältnis Mol. Zucker : Mol. Äthylalkohol = 1 : 2 ob. Wird der Acetaldehyd durch die Festlegung zu einem Hauptprodukte der Zuckerspaltung, so erleidet die Gärungsgleichung folgende Umgestaltung:



Sie sieht das Verhältnis Mol. Zucker : Mol. Aldehyd : Mol. Glycerin wie 1 : 1 : 1 voraus.

Wohl sind wir dazu gelangt, daß aller Zucker auch in Gegenwart des Aldehyd-Bindemittels völlig umgesetzt wird, aber es ließ sich keine 100-proz. Zerlegung des Kohlenhydrates gemäß der idealen, umgeformten Gärungsgleichung erzielen. Der Grund dafür liegt zu einem wesentlichen Grade eben in der Beteiligung des schwefligsauren Salzes am Gärungsvorgange. Zieht man diese in Rechnung, so lautet nämlich die Gesamtgärungsgleichung:



Durch das an sich bereits alkalisch reagierende sekundäre Sulfit und das bei der Umsetzung hinzukommende Natriumhydrocarbonat, mit andern Worten infolge der alkalischen Reaktion des Gärortes, erleidet die Sulfit-Komplexverbindung des Acetaldehyds eine verstärkte

Dissoziation. Der durch das Gleichgewicht bestimmte Teil freien Acetaldehyds steht aber für die normale Verarbeitung, d. h. für die Hydrierung zum Äthylalkohol, zur Verfügung. Demgemäß läuft eine gewöhnliche alkoholische Gärung nebenher. Ihre völlige Unterdrückung, die theoretisch durch Zurückdrängung der Dissoziation mittels eines vermehrten Sulfit-Zusatzes möglich erscheint, scheitert an der Giftigkeit der schwefeligen Salze in zu hoher Konzentration.

Der Gedanke der korrelativen Beziehung zwischen Glycerin und Acetaldehyd, bezw. Glycerin und Brenztraubensäure, den Neuberg und Kerb in den Jahren 1912/13 entwickelt hatten, war somit zu einem experimentellen Beweise der »Acetaldehyd-Brenztraubensäure-Theorie der Gärung« ausgestaltet. Ob die Glycerinbildung synchron mit der Aldehydentstehung geschieht oder ihr zeitlich folgt, mag dahingestellt bleiben. Im Falle der willkürlichen Festlegung der Aldehydstufe mittels des Abfangverfahrens ist die Aldehyd-Fixation zweifellos von ausschlaggebender Bestimmung. Ganz abgesehen davon, daß ein primärer Zerfall der 6-Kohlenstoff-Kette in die ungleichen Reste Glycerin und Brenztraubensäure durch keine chemische Analogie gestützt wird, ergibt sich der geschilderte Zusammenhang eindeutig aus der Abhängigkeit der Glycerin-Ausbeute von der Menge des Abfangmittels und des dadurch gefesselten Acetaldehyds.

Bei der normalen alkoholischen Gärung kommt die Korrelation zwischen Glycerin und Acetaldehyd nicht zum klaren Ausdruck. Die dafür maßgebenden Gründe haben wir früher dargelegt und gezeigt, daß andere Oxydationsäquivalente, insbesondere die Bernsteinsäure und Essigsäure, auf welche letztere wir auch bei der Sulfit-Gärung gefahndet hatten, in hinreichender Menge vorhanden sind. Die höchste Ausbeute an Glycerin, die wir erzielt haben ¹⁾, hat 36.9 % vom Gewicht des angewandten Rohrzuckers oder 35.06 % der ihm zu grunde liegenden Hexosemenge, also rund 70 % der Theorie, betragen. Im dazugehörigen Kontrollversuche waren nur 2.02 % Glycerin entstan- den. Die Steigerung der Glycerinmenge hatte sich also auf das 17.4-fache belaufen. Da durchschnittlich bei der normalen Gärung 3 % Glycerin beobachtet werden, so ist die erzwungene Glycerinbildung recht beträchtlich. Wie jüngst W. Connstein und K. Lüdecke ²⁾ bekannt gegeben haben, sind sie auf demselben Wege, den in den vorerwähnten Arbeiten Neuberg, Färber und Reinfurth bescri- ten hatten, zu einer technisch wichtigen industriellen Gewinnung von Glycerin gelangt. Zur Theorie der Gärung haben ihre Versuche

¹⁾ C. Neuberg und E. Reinfurth, l. c. S. 248 und 264 [1918].

²⁾ W. Connstein und K. Lüdecke, B. 52, 1385 [1919].

keinen Beitrag geliefert; insbesondere tritt in ihnen nicht das molekulare Verhältnis von Acetaldehyd und Glycerin und die Erkenntnis der Zusammenhänge zu Tage, die durch die Feststellung dieser Korrelation sowie durch die Auffindung der Brenztraubensäure-Gärung, der phytochemischen Reduktionen und der Wirkung schwacher Alkalien von uns aufgedeckt worden waren.

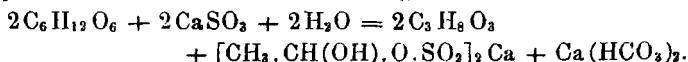
Jene früheren Ergebnisse hatten wir unter Verwendung von obergärigen Hefen gewonnen. Bei der prinzipiellen Bedeutung, die wir der Festlegung der Acetaldehyd-Stufe für das allgemeine Gärungsproblem zuschreiben, schien es uns unerläßlich, die durchgängige Gültigkeit der Beziehungen auch in Gäransätzen mit Unterhefen und Hefedauerpräparaten zu prüfen.

Als Unterhefen standen uns zwei Rassen des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin zur Verfügung. Die Resultate waren mit untergäriger Hefe prinzipiell die gleichen. Bekanntermaßen sind die Unterhefen in der Regel empfindlicher gegen allerlei Zusätze als die Oberhefen. Das machte sich auch in unseren Versuchen insofern geltend, als die Widerstandskraft gegen die Alkalisatoren geringer war. Infolgedessen verschwindet entweder der Zucker nicht vollständig, oder man braucht erheblich größere Mikroorganismenmengen. Diese Besonderheiten der Unterhefen treten jedoch weniger hervor, sobald die Schädigungen durch die Alkalinität des Milieus fortfallen, was wir durch Benutzung von Calciumsulfit¹⁾ oder anderen neutral reagierenden schwefligsauren Salzen erreicht haben. Auch die Dauerhefen, d. h. Trockenpräparate, zu deren Herstellung zumeist untergärrige Rassen dienen, entfalten in Gegenwart des neutralen Calciumsulfits eine bessere Gärwirkung als in Anwesenheit des sie sehr beeinträchtigenden schwefligsauren Natriums.

Diese Verwendung von nicht alkalisch reagierenden Salzen der schwefligen Säure¹⁾ als Abfangmittel ist zugleich für die Theorie des ganzen Vorganges von erheblichem Belang. Ober- wie Unterhefen liefern nämlich auch in Gegenwart des unlöslichen und neutral reagierenden Calciumsulfits Acetaldehyd und Glycerin in dem bekannten korrelativen Mengenverhältnis. Ebenso verhalten sich das unlösliche schwefligsaure Magnesium und das schwefligsaure Zink, sowie Gemische von Dinatriumsulfit mit Phosphorsäure bezw. primärem Alkaliphosphat. In den letztgenannten Fällen bestand sogar eine schwach saure

¹⁾ C. Neuberg, Ztschr. f. Botanik, 1918.

Reaktion. Daraus ergibt sich, daß die Alkalinität des Milieus für diesen Vorgang der gesteigerten Aldehyd- und Glycerin-Bildung nicht ausschlaggebend ist, sondern lediglich die von den schwefligsauren Salzen¹⁾ ganz allgemein verursachte Fesselung des Acetaldehyds. Denn auch die unlöslichen Salze der schwefligen Säure legen den Acetaldehyd fest, die Calciumverbindung z. B. nach der Gleichung:



Die Wirksamkeit der unlöslichen Salze zeigt zugleich, daß osmotische Vorgänge bei der ganzen Erscheinung nur eine untergeordnete Rolle spielen dürften, eine Schlußfolgerung, welche bereits aus der Arbeit von Neuberg und Färber, die ja mit zellfreien Hefensäften gearbeitet hatten, zu ziehen war. Übrigens haben wir uns davon überzeugt, daß das unlösliche Calciumsulfite in rein enzymatischen Gäransätzen gleichfalls seinen Einfluß ausübt (siehe S. 1699—1700). Wie wir früher dargelegt haben, hängen die Ausbeuten an Aldehyd und damit an Glycerin in doppelter Weise von der absoluten Menge des Abfangmittels ab; einmal wird umso mehr intermediär entstehender Acetaldehyd von der normalen Verwendung, d. h. von der Hydrierung zum Äthylalkohol, abgedrängt, je mehr schwefligsaures Salz zugegen ist. Dann ist aber auch für die Beständigkeit des gebildeten Sulfite-Komplexes die Gegenwart eines hinreichenden Sulfite-Überschusses maßgebend, welcher der hydrolytischen Dissoziation der Aldehyd-Sulfite-Doppelverbindung entgegenwirkt. Daraus ergibt sich ohne weiteres, daß im Falle der Verwendung unlöslicher Sulfite die Ausbeute nicht die Höhe erreichen kann, wie bei löslichen schwefligsauren Salzen. Trotzdem lassen sich beträchtliche Leistungen auch mittels $CaSO_3$ erzielen, wenn man auf mechanischem Wege die Berührung von Abfangmittel und Gärgut innig gestaltet (s. z. B. S. 1690—1692).

Außerdem stellt die Verwendung des Calciumsulfites eine wesentliche Bereicherung der Methodik dar. Sie erlaubt nämlich die Ausdehnung des Abfangverfahrens auf die Untersuchung intermediärer Stoffwechselforgänge auch solcher Mikroorga-

¹⁾ Im Prinzip sind alle Sulfite brauchbar. Wir haben die folgenden geprüft, deren Kationen der 2., 3., 4. und 6. Wertigkeitsstufe angehören, und bezeichnen den Grad ihrer Eignung (mäßig, befriedigend, gut) durch +, ++ und +++: Strontium-(+++), Barium-(+++), Beryllium-(+++), Mangan-(+++), Ferro-(+++), Blei-(+), Aluminium-(++), Wismut-(+++), Thorium-(++) und Uranyl-Sulfite(+). Wir bemerken dazu, daß die auf Hefe stark agglutinierend wirkenden schwefligsauren Salze von Al, Bi, Th und U am besten erst zu den vorher angelegenen Ansätzen gegeben werden.

nismen, die gegen ein alkalisches Medium oder gegen eine höhere Konzentration an löslichen Salzen empfindlich sind. Wir verweisen nach dieser Richtung auf die soeben erschienenen Veröffentlichungen von Neuberg und Nord¹⁾, welche insbesondere durch Wahl des Calciumsulfits als Abfangmittel den Acetaldehyd als ganz allgemeine Durchgangsstufe bei bakteriellen Gärungsvorgängen erkannt haben. Das ist z. B. der Fall bei der Zerlegung der Kohlenhydrate durch Coli-Bakterien, die der alkoholischen Zuckerspaltung verwandt ist, und bei den Gärungen, welche die Erreger der Ruhr und des Gasbrandes sowie die Essigsäure-Bakterien auslösen. Die Verwendung des Calciumsulfits ermöglicht aber auch die Heranziehung von Substraten, die einen Zusatz des alkalisch reagierenden Dinatriumsulfits nicht ertragen, so das Studium des Verhaltens von Glycerinaldehyd und Dioxy-aceton, von denen weiter unten die Rede ist.

Im Hinblick auf die von der Theorie geforderte Abhängigkeit der Ausbeute nicht nur von dem absoluten Zahlenwert Zucker zu schwefligsaurem Salz, sondern auch von der herrschenden *Konzentration*, haben wir einige Versuche über den Ertrag an Acetaldehyd und Glycerin in verdünnten Gäransätzen angestellt. In der S. 1682 wiedergegebenen, unserer früheren Mitteilung entlehnten Tabelle zeigte sich, daß bei einem Verhältnis von 130 g Dinatriumsulfit zu 100 g Zucker 18.65 g Acetaldehyd und 36.90 g Glycerin entstanden waren. Diese Ausbeute bezog sich auf einen Gäransatz, bei dem die Konzentration an Rohrzucker 4 % und die an Sulfit 6 % betragen hatte. In einer Reihe von Versuchen, in denen ungefähr die gleichen relativen Mengenverhältnisse zwischen Zucker und Sulfit obgewaltet haben, die Verdünnung in bezug auf Zucker und entsprechend auf Sulfit jedoch größer war (siehe Versuche Nr. 12—17, S. 1695), sank erwartetermaßen trotz glatten Verlaufes der Gärung die Ausbeute an Acetaldehyd und Glycerin. Selbst Steigerungen des Sulfits auf 200 %, ja sogar auf fast 300 % vom Gewichte des Zuckers, die ja nur in stärkeren Verdünnungen von der Hefe ertragen werden, lieferten unter diesen Bedingungen kein höheres Ergebnis, eben wegen der Konzentrationsverminderung, welche die Bildung des Aldehyd-Sulfit-Komplexes erschwert und seine Dissoziation fördert.

Wir haben bereits früher²⁾ hervorgehoben, daß die Hefen, wenigstens die widerstandsfähigen Oberhefen, in den Sulfit-Maischen nicht

¹⁾ C. Neuberg und F. F. Nord, Bio. Z. 96, 133, 158 [1919].

²⁾ Bio. Z. 92, 249 [1918].

zu Grunde gehen, sondern nach vollbrachter Leistung noch gärfähig sind. Dementsprechend konnten wir schon damals zeigen, daß das Ergebnis von der absoluten Menge der Hefe ziemlich unabhängig ist. Einen weiteren Beweis für dieses Verhalten erbringen wir mit der Durchführung von Versuchen (Nr. 18 u. 19 S. 1696) mittels eines minimalen Hefequantums.

In unserm vorerwähnten Gärungsschema aus dem Jahre 1913 sind andere, sonst wohl als Zwischengebilde in Betracht gezogene Substanzen — wie die beiden Triosen und die Fructose-diphosphorsäure — mit voller Absicht nicht aufgenommen worden, da kein zwingender Beweis für ihr Auftreten unter normalen Bedingungen, d. h. bei der Vergärung mit lebenden Hefen, vorliegt; von diesen wird überhaupt keine der drei genannten Verbindungen vergoren. Diese Tatsache, der man sich nicht verschließen kann, ist auch ein Grund dafür, daß wir Glycerinaldehyd und Dioxy-aceton nicht als unmittelbare Vorstufen für die korrelativ entstehenden Substanzen Acetaldehyd und Glycerin annehmen, sondern letztere lieber über Methyl-glyoxal und Brenztraubensäure aus dem Zucker herleiten; denn gerade das Methyl-glyoxal bietet dank der vielgestaltigen Fähigkeit des Auftretens in mehr als 22 Formen zahlreiche Möglichkeiten, während das Experiment hinsichtlich der beiden Triosen keine Anhaltspunkte gewährt. Nichts erscheint zunächst leichter, als eine Zurückführung des Glycerins auf Glycerinaldehyd oder Dioxy-aceton, die durch eine einfache Depolymerisation aus den Hexosen entstanden gedacht werden können. Der Glycerinaldehyd könnte sodann mit Hilfe der Cannizzarosen Reaktion in Glycerin und Glycerinsäure übergehen. Letztere wird sogar, wie Neuberg, Hildesheimer und Tir¹⁾ gefunden haben, von Hefe angegriffen. Aber ihre von Lebedew²⁾ behauptete Umwandlung in Acetaldehyd und Kohlendioxyd erfolgt in so geringem Ausmaße³⁾ und insbesondere mit lebenden ober- wie untergärigen Hefen, die bei den alkalischen Gärungen doch glatt verwendbar sind, gar nicht oder so unsicher, daß man diese einfache Formulierung bisher nicht in Betracht zu ziehen berechtigt ist. Von Hefenmacerationssaft werden zwar die Triosen langsam und unvollständig angegriffen, wobei nach M. Oppenheimer⁴⁾ Glycerin und Milchsäure auftreten. Aber durch lebende Hefen läßt sich, wie gesagt, keine in Betracht kommende Veränderung erzielen.

Wir haben nun geprüft, ob die Triosen unter dem Einfluß von Sulfit in korrelativer Menge Acetaldehyd und Glycerin zu liefern imstande sind. Freilich konnten wir bei Zusatz von Calciumsulfit und Hefe zu Dioxy-aceton-Lösungen mehrfach eine Bildung von Acetaldehyd feststellen. Aber die Glycerin-Erzeugung

¹⁾ C. Neuberg und A. Hildesheimer, *Bio. Z.* 31, 170 [1911]; C. Neuberg und L. Tir, *Bio. Z.* 32, 323 [1911].

²⁾ A. v. Lebedew, *B.* 47, 965 [1914].

³⁾ C. Neuberg und J. Kerb, *B.* 47, 1308 [1914].

⁴⁾ M. Oppenheimer, *H.* 89, 45, 63 [1914].

stand mit der Aldehyd-Produktion nicht im Einklange; sie war nämlich unregelmäßig, gelegentlich auch größer, als dem korrelativen Verhältnis der beiden genannten Substanzen von je 1 Mol. Reduktionsprodukt zu je 1 Mol. Oxydationsstufe entspricht. Im Gegensatz zum Dioxy-aceton wurde der Glycerinaldehyd in entsprechenden. einwandfrei¹⁾ verlaufenen Versuchen gar nicht nachweisbar verändert. Selbst mit der so überaus scharfen Nitroprussidnatrium-Reaktion haben wir die Entstehung von Acetaldehyd nur in Spuren feststellen können, so daß gerade der Aldehyd der Triosen-Reihe, der doch in erster Linie zur Disproportionierung in Glycerin und Glycerinsäure (bezw. weiterhin in Acetaldehyd und Kohlendioxyd) befähigt erscheinen sollte, nach dem Ausfall der experimentellen Ergebnisse bisher nicht als das Zwischenglied gelten kann. Das etwas andere, aber keineswegs eindeutige Verhalten des isomeren Dioxy-acetons mag mit sekundären Umwandlungen dieser Substanz zusammenhängen, die wohl auch jene unsichere²⁾ unter bestimmten Bedingungen sich offenbarende Gärfähigkeit herbeiführen.

Im Zusammenhange mit den verschiedenen behandelten Fragen haben wir auch das Verhalten der Selbstgärung unter dem Einfluß von Sulfit mehrfach verfolgt. Im allgemeinen haben wir dabei keine wesentliche Bildung von Acetaldehyd nachweisen können. Es muß dahingestellt bleiben, ob die Selbstgärung durch diese Zusätze unterdrückt oder in andere Bahnen gelenkt wird, oder ob sie überhaupt, was schon öfter in Zweifel gezogen wurde, eine vollkommene Analogie zu den Vorgängen der normalen Gärung bietet.

Schließlich hat die Anwendung des schwefligsauren Calciums als Abfangmittel eine Verbesserung unserer Ergebnisse bei der Sulfit-Gärung der Brenztraubensäure ermöglicht. Mit CaSO_3 an Stelle des früher benutzten Dinatriumsulfits kann man nämlich die Vergärbarkeit von Brenztraubensäure auch in Gegenwart der Abfangmittel in vollkommenerer Weise dartun. War es uns ehemals nur gelungen, etwa 20 % der theoretisch möglichen

¹⁾ Glycerinaldehyd und Dioxy-aceton neigen in alkalischen Lösungen oder auch in Gegenwart des neutral reagierenden Calciumsulfits außerordentlich zur Fäulnis. Ferner kommen, sobald die natürliche Acidität irgendwie abgestumpft ist, besonders leicht Kahlhefen hoch, umsomehr als bei der bekannten Schwurangreifbarkeit dieser 3-Kohlenstoff-Zucker die Versuchszeiten häufig gedehnt werden mußten. Wie Neuberg und Nord (l. c.) gezeigt haben, erzeugen Bakterien aus allen möglichen Stoffen in Gegenwart des Abfangmittels leicht Acetaldehyd. Wegen dieser Bildung durch andere Keime ist auf Sterilität bei den Versuchen mit Glycerinaldehyd und Dioxy-aceton besonders zu achten.

²⁾ Wir verweisen auf die Ausführungen von Slator, Harden und Young, Mazé, sowie von Neuberg und Mitarbeitern über diese Frage.

Menge Acetaldehyd bei der Sulfit-Gärung der Brenztraubensäure zu erhalten, so stieg mit der neuen Versuchsanordnung die Ausbeute auf rd. 55 %.

Die »Acetaldehyd-Brenztraubensäure-Theorie der Gärung« findet durch die vorangehend mitgeteilten neuen Versuche eine weitere Bestätigung. Die Fesselung der Acetaldehyd-Stufe in einem Umfange von mehr als 70 % der möglichen Menge verleiht der Theorie solch einen Grad von Wahrscheinlichkeit, wie er für einen biologischen Prozeß überhaupt gefordert werden kann. Ein Eingriff in die Hauptphase, der durch die Blockierung des Acetaldehyds von den schwefligsauren Salzen ausgeübt wird, muß natürlich am Gegenort des Systems eine Änderung herbeiführen. Der Ausgleich besteht, da die Fixation des Acetaldehyds die Festlegung einer Oxydationsstufe bedeutet, in der äquivalenten Bereitstellung eines Reduktionsproduktes, des Glycerins.

Wie schon Neuberg und Färber dargetan hatten, lassen sich solche experimentellen Verschiebungen auch durch andere Stoffe, z. B. durch alkalisch reagierende Salze, erreichen, die zum Acetaldehyd keine erkennbare Affinität von der Natur aufweisen, wie sie den Sulfiten eigen ist. Hier setzen die Untersuchungen von C. Neuberg und J. Hirsch ein¹⁾. Sie zeigen, daß trotzdem beide Arten der Beeinflussung des Gärungsvorganges wesensgleich sind. Denn ein alkalisches Zusatzmittel, z. B. Natriumbicarbonat, greift gleichfalls an der Phase des Acetaldehyds an, indem es dessen sekundäre Disproportionierung in Äthylalkohol und Essigsäure veranlaßt. In diesem Falle sind nicht Acetaldehyd und Glycerin korrelative Gärprodukte, vielmehr bilden die Erzeugnisse einer Cannizzaroschen Umlagerung des ersteren, Essigsäure und Äthylalkohol, die Gegenstücke zum Glycerin.

Nachdem nun mit Hilfe des Abfangverfahrens die Festlegung der Acetaldehydstufe auch bei den bakteriellen Gärungen gelungen ist, enthüllt sich völlig unerwartet die allgemeine Bedeutung des Acetaldehyds im biochemischen Umsatz der stickstofffreien Substanz.

Auszüge aus den Protokollen.

Calciumsulfid als Abfangmittel.

Wie zuvor auseinandergesetzt wurde, ist die Verwendung des Calciumsulfids zur Festlegung der Aldehyd-Stufe von theoretischem Interesse; sie bedeutet zugleich eine methodische Erweiterung. Dieses

¹⁾ C. Neuberg und J. Hirsch, Bio. Z. **96**, 175 [1919].

neutral reagierende und unlösliche Salz bewirkt die Fesselung des Acetaldehyd-Gliedes und die davon abhängigen weiteren Veränderungen in den Gärungsprodukten in deutlicher Weise.

Für den gedachten Zweck ist das käufliche schweflige Calcium, zu meist die wasserfreie Verbindung CaSO_3 , ungeeignet. Man stellt es am besten frisch her durch doppelte Umsetzung von sekundärem schweflige sauren Natrium (100 g wasserfreiem oder 200 g wasserhaltigem Salz in 500 ccm Wasser) mit einer konzentrierten heißen Lösung von $\text{CaCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ (175 g). Im ersten Augenblicke fällt das schweflige Calcium gelatinös aus, wird aber beim Umrühren schnell pulverig. Man erhitzt dann noch 15 Minuten auf dem Wasserbade, saugt ab, was leicht von statten geht, und wäscht erst mit Leitungswasser, dann mit destilliertem Wasser chloridfrei. Wenn das als Ausgangsmaterial verwendete Dinatriumsulfid Glaubersalz enthält, so ist dem durch Wechselwirkung entstandenen Calciumsulfid Gips beigemischt, der jedoch die Verwendung nicht stört. Das gut abgepreßte Salz wird am besten ein wenig feucht, aber unter Luftabschluß aufbewahrt. Es entspricht der Formel $\text{CaSO}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$ und wirkt als Abfangmittel sehr viel besser als die Handelsware.

Wegen der Unlöslichkeit in Wasser und der daraus resultierenden Minderung der Leistungsfähigkeit empfiehlt es sich, für eine möglichst innige Berührung des schweflige sauren Calciums mit dem Gärgut zu sorgen. Das erreicht man am leichtesten durch Schütteln oder gleichzeitiges Durchleiten von Kohlensäure oder am besten durch beide Maßnahmen. Der Effekt der besseren mechanischen Verteilung gibt sich deutlich in den Ausbeuten an Gärungsendprodukten zu erkennen.

Versuch 1. In einer Lösung von 17.1 g Rohrzucker (= 18 g in ihm enthaltener Hexosen) samt den erforderlichen Nährsalzen¹⁾ in 180 ccm Wasser wurde die aus 12.6 g wasserfreiem Natriumsulfid bereitete Menge schweflige sauren Calciums suspendiert und 5 g Bäckerhefe verteilt. Die Gärung war bei 34^o) bereits nach 24 Stdn. beendet. Das Gesamtvolumen betrug 205 ccm. Zur Aldehyd-Bestimmung dienten 100 ccm der Urlösung. Im Fall der Verwendung von Calciumsulfid vereinfacht sich unsere Methodik der Aldehyd-Ermittelung. Es kann nämlich eben wegen der geringen Löslichkeit des schweflige sauren Calciums die beim Dinatriumsulfid als notwendig erkannte Behandlung mit Chlorbarium fortfallen, da wesentliche Mengen von Sulfid-Ionen, welche der Freimachung des Aldehyds aus dem Sulfid-Komplex entgegenwirken, hier nicht in Lösung sind. Natürlich ist die Zugabe von kohlen saurem Calcium, welche den Aldehyd aus dem im Gärgut vorliegenden aldehyd-schweflige sauren Calcium austreibt: $[\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{O} \cdot \text{SO}_2]_2 \text{Ca} + \text{CaCO}_3 = 2\text{CH}_3 \cdot \text{CHO} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{CaSO}_3$, bei der Wasserdampf-Destillation unerläßlich. Im übrigen verweisen wir hinsichtlich der

¹⁾ Diese Bedingungen waren in allen folgenden Versuchen die gleichen, sofern nichts Besonderes angegeben ist.

Ausführung auf die von uns früher empfohlenen Vorsichtsmaßregeln unserer Arbeitsweise¹⁾, die zuverlässige Aldehyd-Zahlen liefert.

Wir fanden in 100 ccm Urlösung 0.1683 g Aldehyd, im ganzen also 0.3450 g = 1.92% vom Gewichte der im Rohrzucker vorhandenen Hexosenmenge²⁾.

Versuch 2. Das aus 39 g wasserfreiem Dinatriumsulfit gewonnene Calciumsalz wurde in einer Lösung von 17.1 g Rohrzucker in 200 ccm Wasser zusammen mit 5 g Bäckerhefe aufgeschwemmt. Mit Wasser wurde ein Gesamtvolumen von 300 ccm hergestellt und durch einen doppelt durchbohrten, mit Gaszu- und -abführungsrohr versehenen Stopfen ein kräftiger Strom von Kohlendioxyd eingeleitet. Der bei Zimmertemperatur (etwa 20°) belassene Ansatz war nach 72 Stdn. ausgegoren. In einigen ccm des sich leicht klärenden Gärgutes fiel nach dieser Zeit die Ostsche Probe³⁾ negativ, die Nitroprussidnatrium-Reaktion stark positiv aus.

In 150 ccm Gärgut stellten wir 0.2843 g, im ganzen also 0.5686 g Acetaldehyd fest = 3.16% der zur Anwendung gelangten Menge 6-Kohlenstoff-Zucker. Als deutlicher Erfolg der durch die Kohlensäure-Durchleitung bewirkten besseren Verteilung des Abfangmittels tritt der höhere Ertrag an Acetaldehyd zutage.

Versuch 3. Die gleiche Menge schwefligsauren Calciums wurde mit einer Lösung von 8.55 g Rohrzucker (= 9 g Hexosen) und mit 3 g Bäckerhefe zusammengebracht; das Gesamtvolumen betrug 550 ccm. Die Gärung geschah wieder bei Zimmertemperatur, und zwar unter dauernder Bewegung in einem Schüttelapparate bei gleichzeitiger Hindurchschickung eines Kohlensäure-Stromes. Im ganzen wurden nach 80 Stdn. 0.8830 g Acetaldehyd = 9.81% erhalten.

Versuch 4. Lehrt bereits der Versuch 3 die Leistung gemeinsamer Schüttelung und Gasdurchleitung, so ist im Versuch 4 dabei noch eine weiter gesteigerte Aldehyd-Ausbeute zu beobachten, wenn daneben eine Vermehrung des Abfangmittels vorgenommen wird. Hier kam die aus 63 g wasserfreiem Dinatriumsulfit hergestellte Menge Calciumsalz zusammen mit 2.5 g Bäckerhefe zur Einwirkung auf nur 5.7 g Rohrzucker (= 6.0 g Hexosen) unter sonst gleichen Bedingungen. Nach 4 Tagen war die Gärung beendet. Sie lieferte 0.6336 g Acetaldehyd = 10.56% vom Gewichte der angewandten 6-Kohlenstoff-Zucker; das macht 43.19% der überhaupt möglichen Menge aus. Dieses Ergebnis zeigt, daß die richtige Verwertung des Calciumsulfites eine weitgehende Festlegung der Aldehyd-Stufe ermöglicht.

Die Versuche mit schwefligsaurem Calcium, bei denen gleichzeitig außer der entwickelten Gärungskohlensäure noch Kohlendioxyd als

¹⁾ C. Neunberg und E. Reinfurth, *Bio. Z.* 89, 389 [1918].

²⁾ Die Ausbeute ist stets auf die dem Rohrzucker-Quantum entsprechende Menge 6-Kohlenstoff-Zucker bezogen.

³⁾ Wie wir früher (*Bio. Z.* 89, 401; 92, 259 [1918]) gezeigt haben, ist zur Prüfung auf reduzierende Zucker in diesen Fällen die Ostsche Lösung anzuwenden, da sie auf Acetaldehyd nicht anspricht.

Gasstrom durch die Maischen geführt wurde, weisen besonders deutlich die Unabhängigkeit dieses Abfangvorganges von der Alkalinität aus.

Wir haben schon früher hervorgehoben, daß angesichts der vollkommenen Korrelation zwischen Aldehyd- und Glycerin-Bildung die leichter und schneller ausführbare Aldehyd-Bestimmung zugleich ein Maß für die Menge des entwickelten Glycerins abgibt, die rund doppelt so groß ist. Wir haben uns aber besonders davon überzeugt, daß das von Theorie geforderte molekulare Verhältnis zwischen Acetaldehyd und Glycerin auch in den Gäransätzen mit schwefligsaurem Calcium wirklich obwaltet. In Ansatz 5 wurde daher außer der Ermittlung von Acetaldehyd auch die von Glycerin vorgenommen.

Das Analysenverfahren für das Glycerin vereinfacht sich dabei insofern, als die im Fall des löslichen Dinatriumsulfits erforderliche Ausfällung mit Chlorbarium¹⁾ fortbleiben kann. Die Behandlung mit Barytwasser, welches die im gelösten Aldehyd-Sulfit-Komplex vorhandene schweflige Säure beseitigt, behielten wir jedoch bei.

Versuch 5. 17.1 g Rohrzucker in 260 ccm Wasser wurden mit 220 g lufttrockenem schwefligsauren Calcium und 5 g Bäckerhefe in der beschriebenen Weise bei Zimmertemperatur digeriert. In dem nach 4 Tagen ausgegorenen Gärgute wurden 1.2252 g Acetaldehyd = 6.81% und 2.5550 g Glycerin = 14.20% festgestellt.

Es ist nicht erforderlich, fertiges Calciumsulfit anzuwenden, sondern es genügt auch, die Verbindung im Gärgute entstehen zu lassen.

Versuch 6. Den Effekt veranschaulicht folgender Versuch: 8.55 g Rohrzucker wurden in 50 ccm Wasser gelöst und zunächst mit 25 g Calciumcarbonat sowie mit 5 g Bäckerhefe versetzt. Unter gutem Umschütteln ließen wir alsdann innerhalb eines Tages eine frisch bereitete wäßrige Lösung von 12.8 g SO₂ in 355 ccm Wasser zulaufen. Während des Eintropfens wurden noch dreimal je 25 g kohlensaures Calcium nachgefüllt. Bei Zimmertemperatur ging die Gärung in 72 Stdn. zu Ende. Sie lieferte im ganzen 0.7803 g Acetaldehyd = 8.67%.

Man kann übrigens auch einen ganz langsamen, regulierten SO₂-Strom in die dauernd gut aufgerührte Suspension von CaCO₃ und Hefe in Zuckerlösung einleiten.

Demnach ist Calciumsulfit im Entstehungszustande oder, allgemeiner ausgedrückt, schweflige Säure in Gegenwart eines geeigneten Neutralisationsmittels ein wirksames Abfangreagens. Dieses Resultat erfährt eine weitere Bestätigung durch die Versuche mit anderen unlöslichen Salzen der schwefligen Säure, namentlich mit Magnesium- sowie Zinksulfit.

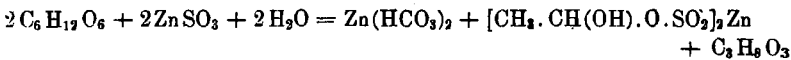
¹⁾ Vergl. unsere frühere Mitteilung Bio. Z. 92, 252 [1918].

Magnesium- und Zinksulfit als Abfangmittel.

Versuch 7. Die Lösung von 8.55 g Rohrzucker wurde mit 5 g Bäckerhefe sowie mit der aus 6.3 g wasserfreiem Dinatriumsulfit bereiteter schwefligsaurer Magnesia versetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 210 ccm gebracht. Unter Kohlensäure-Durchleiten und beständigem Schütteln ging der Versuch in 4 Tagen zu Ende. Er lieferte im ganzen 1.3592 g Acetaldehyd = 15.10%.

Versuch 8. Nicht ganz so glatt, aber mit dem gleichen Schlußergebnis verliefen die Zinksulfit-Versuche. Es kamen z. B. zur Anwendung die aus 63 g Dinatriumsulfit bereitere Menge schwefligsaurer Zinks, 3 g Bäckerhefe und die Lösung von 8.55 g Rohrzucker. Das Volumen betrug 480 ccm. Nach 24 Stdn. war bereits eine kräftige Riminische Reaktion festzustellen, aber gleichzeitig auch noch viel unveränderter Zucker mit der Ostschens Probe. Letztere blieb trotz zunehmender Steigerung des Aldehyd-Gehaltes auch nach 4 Tagen stark. Nach dieser Zeit wurden deshalb noch 3 g Bäckerhefe zugefügt, die jedoch in 7 weiteren Tagen den Zucker nicht umzusetzen vermochten. Erst eine nochmalige Zugabe von weiteren 3 g Hefe brachte nunmehr den Zucker in 72 Stdn., d. h. im ganzen nach 14 Tagen, nahezu vollständig zum Verschwinden. Die Lösung zeigte im 1-dm-Rohr noch eine Linksdrehung entsprechend -0.15° Traubenzucker. Gemäß dem gewaltigen Ausfall der Nitroprussidnatrium-Reaktion war die Ausbeute an Acetaldehyd groß; sie belief sich auf 1.3613 g = 15.12%.

Bei der Behandlung mit Zinksulfit gehen viel Zinksalze in die Flüssigkeit über und zwar hauptsächlich in Form von Zinkhydrocarbonat und aldehyd-schwefligsaurem Zink, die nach der Gleichung:



entstehen.

Die Anwesenheit der löslichen Zinkverbindungen gibt sich durch die tiefe Rötung zu erkennen, welche bei Zugabe von Nitroprussidnatrium zum filtrierten Gärgut eintritt (Sulfit-Prussid-Reaktion)¹⁾ und durch Zinksalze bekanntlich in charakteristischer Weise verstärkt wird.

Zur Kontrolle haben wir übrigens einen Versuch angesetzt, in dem die gleiche Menge Zucker mit 75 g Zinkcarbonat und 1 g Zinksulfat²⁾ sowie mit 3 g Hefe unter sonst gleichen Bedingungen digeriert wurde. Dieser Ansatz ging glatt in 72 Stdn. aus und lieferte direkt keine nachweisbare Menge Aldehyd, durch Destillation eine eben erkennbare Spur.

Versuch 9. Das gleiche Quantum schwefligsaurer Zinks wie in Ansatz 8 wirkte hier auf die doppelte Zuckermenge ein, und zwar auf 17.1 g Rohrzucker (18 g Hexosen entsprechend). Trotz viermaligen Zusatzes von je 5 g Hefe ging die Vergärung in 15 Tagen nicht zu Ende; die Lösung reduzierte

¹⁾ K. A. Hofmann, C. 1896, I 359.

²⁾ Dies lösliche Zinksalz wurde zugegeben, da ja möglicherweise im Sulfit-Versuche aus dem schwefligsauren Zink etwas Sulfat sich bilden kann.

zum Schluß noch deutlich, die Drehung entsprach einem Gehalt von -0.7° Glucose¹⁾). In toto ermittelten wir 1.5829 g Aldehyd = 8.79%. Demnach ist bei relativ geringerem Zinksulfit-Gehalt auch der Aldehyd-Ertrag kleiner.

Durchführung von Abfangversuchen bei saurer Reaktion.

Zur Bestätigung der Anschauung, daß die spezifische Affinität der schwefligen Säure zum Acetaldehyd, weniger aber die alkalische oder neutrale Reaktion der Gäransätze, die Veränderung in den Endprodukten der Zuckerspaltung verursacht, schien uns die Anstellung von Versuchen bei saurer Reaktion wünschenswert. Mit löslichen Sulfiten sind solche Experimente nur schwer durchführbar, da leicht zu viel schweflige Säure, ein heftiges Gift für die Hefenzelle, frei wird. Zum Ziele aber gelangt man, wenn man auf das unlösliche schwefligsaure Calcium saures Phosphat (siehe Versuch 10) oder auch freie Phosphorsäure (siehe Versuch 11) einwirken läßt. In diesen Fällen nahmen wir von einem Zusatz der Nährsalze Abstand, um nicht unnötig Pufferwirkungen derselben zur Geltung zu bringen, und ließen die Gärung bei Zimmertemperatur ablaufen.

Versuch 10. Eine Lösung von 8.55 g Rohrzucker wurde mit einer Suspension von schwefligsaurem Calcium (bereitet aus 63 g wasserfreiem Dinatriumsulfit) und 5 g Oberhefe, sowie mit einer Lösung von 7 g Monokaliumphosphat versetzt. Das Gemisch blieb bei Zimmertemperatur stehen. Nach 72 Stdn. war eine schwache Riminische Reaktion, aber noch ein gewaltiges Reduktionsvermögen gegen Ostsche Lösung vorhanden. Nach 10 Tagen war die Nitroprussidnatrium-Probe deutlich, aber noch viel unveränderter Zucker zugegen; es wurden deshalb 5 g Hefe nachgegeben. Nach 26 Tagen wurde der Versuch abgebrochen, obwohl noch eine deutliche Reduktionskraft und eine Rechtsdrehung entsprechend 0.1% Traubenzucker bestand. Während der ganzen Zeit herrschte eine mäßig saure Reaktion auf Lackmus. Die Aldehyd-Bestimmung, die in diesem Falle wegen Gegenwart gelösten Sulfiten nach Behandlung der zuvor zu neutralisierenden Flüssigkeit mit Bariumchlorid (und unter Zufügung kohlensauren Calciums bei der Destillation) ausgeführt werden muß, ergab im ganzen 1.3372 g = 14.86% Acetaldehyd.

Versuch 11. Der Ansatz entsprach dem von Versuch 10 mit dem Unterschiede, daß zur Herstellung einer schwach sauren Reaktion direkt freie Phosphorsäure verwendet wurde, und zwar in einer Menge von 15.0 ccm $\frac{1}{2}$ -H₃PO₄. Das hatte eine Agglutination des ersten Hefezusatzes zur Folge. Die Entwicklung der Nitroprussidnatrium-Reaktion und die Abnahme der Reduktion (nach Ausweis der Ostschen Probe) vollzogen sich in ähnlicher Weise. Nach 48 Stdn., nach 7 sowie nach 14 Tagen wurden je 3 g Oberhefe nachgefüllt. Erst nach 42 Tagen war der reduzierende Zucker nahezu verschwunden. Die Ausbeute an Aldehyd betrug dann 1.3700 g = 15.22%.

¹⁾ Die Invertase wirkt demnach auch in Gegenwart von Zinksalzen.

Die Versuche 10 und 11 lehren, daß sich bei schonender Art der Ausführung auch in einem sauren Medium eine Fesselung der Aldehyd-Stufe in beträchtlichem Umfange ermöglichen läßt.

Der Einfluß der Verdünnung auf den Umfang der Aldehyd-Festlegung.

Die Theorie verlangt, daß mit Verringerung der Konzentration an Abfangmittel die fixierbare Aldehyd-Menge sinkt. Mit dieser Forderung stehen die experimentellen Befunde der Ansätze 12—17 durchaus im Einklange.

Versuch 12. 17.1 g Rohrzucker wurden zusammen mit den Nährsalzen in 180 ccm Wasser gelöst und nach gerade begonnener Angärung durch 5 g Oberhefe mit einer Lösung von 25.2 g wasserfreiem Dinatriumsulfit in ca. 1 l Wasser versetzt. Das Gesamtvolumen betrug 1350 ccm. Die Gärung war nach 6 Tagen beendet. Die Aufarbeitung, die hier wegen Verwendung des löslichen und alkalisch reagierenden Natriumsalzes in der von uns seinerzeit angegebenen Weise erfolgen mußte, ergab 1.8820 g Acetaldehyd = 10.46%.

Versuch 13. Entsprach, bis auf die doppelt so große Hefenmenge, vollkommen dem Ansatz 12. Der mit ihm zusammen angestellte und gleichzeitig beendete Versuch ergab für die 1350 ccm Gesamtflüssigkeit 2.1596 g Aldehyd = 11.98%.

Versuch 14 und 15. Hier kamen als Bestandteile der Gäransätze folgende Mengen zur Anwendung: Je 17.1 g Rohrzucker und 37.8 g Na_2SO_3 ; bei Nr. 14 wurden 5 g Oberhefe, bei Nr. 15 davon 10 g hinzugefügt. Das Volumen betrug in beiden Fällen 1800 ccm, die Gärdauer 4 Tage und die Gesamtausbeute in Nr. 14 1.9950 g = 11.08%, in Nr. 15 1.9650 g = 10.92% Acetaldehyd.

Versuch 16 und 17. Eine weitere Steigerung erfuhr die Sulfitmenge in den Ansätzen 16 und 17.

Hier gelangten bei einem Gesamtvolumen von 2800 ccm je 50.4 g wasserfreies Dinatriumsulfit zur Einwirkung auf die Lösung von je 17.1 g Rohrzucker, und zwar in Versuch 16 bei Anwesenheit von 10 g, in Versuch 17 von 20 g Oberhefe. Nach 5 Tagen war die Gärung beendet. Trotz der großen Sulfitmenge war durch Polarisation und mittels der Ostschens Probe kein Zucker mehr nachweisbar. In Versuch 16 wurden erhalten im ganzen 1.3054 g = 7.25%, in Versuch 17 1.4341 g = 7.97% Acetaldehyd.

Es ist bemerkenswert, daß die Invertase auch in Gegenwart dieser großen Mengen alkalisch reagierenden Dinatriumsulfits prompt wirksam gewesen war.

Die starke Verdünnung, in der sich der Gärakt in den Versuchen 16 und 17 abgespielt hat, ist, wie bereits in der Einleitung hervorgehoben wurde, der Grund, daß trotz der hohen absoluten Menge von Sulfit die Acetaldehyd-Ausbeute hinter dem Ertrage sulfit-

ärmerer Ansätze zurückblieb, in denen die Konzentration des Abfangmittels jedoch höher bemessen war.

Nach erfolgter, bei 35° abgelaufener Ausgärung war das Gärgut in beiden Fällen noch weitere 4 Tage im Eisschrank bei 4° aufbewahrt worden. Die dann abfiltrierte und mit etwas Leitungswasser an der Zentrifuge gewaschene Hefe rief in Rohrzuckerlösung wieder glatt Vergärung hervor. Wie wir schon früher (l. c. S. 249) hervorgehoben haben, bleiben nicht nur einzelne Enzyme, wie die Invertase, in der ungewohnten Umgebung erhalten, sondern die Hefezellen selbst bewahren ihre Gärkraft.

Einfluß der Hefenmenge auf die Leistung des Abfangverfahrens.

Genau wie die normale Gärung mit einem kleinen Fermentquantum zu Ende geht, so ist auch der Erfolg der Abfangmethode von der anwesenden Hefenmenge ziemlich unabhängig. Dieses Ergebnis tritt bei Verwendung einer geringfügigen Aussaat Oberhefe zu Tage, damit bestätigend, daß die Zusätze nur eine Verschiebung in den Gärungsendprodukten, aber keine prinzipiell neuartigen Spaltungen des Zuckers veranlassen.

Versuch 18. Die mit 2 g Oberhefe zur Angärung gebrachte Lösung von 17.1 g Rohrzucker in 120 ccm Wasser wurde mit einer solchen von 12.6 g wasserfreiem Dinatriumsulfit in 100 ccm Wasser gemengt. Nach Herstellung eines Gesamtvolumens von 240 ccm wurde das Gemisch bei 35° belassen. Nach 3 Tagen war noch deutlich Zucker nachweisbar, nach 12 Tagen war er jedoch vollständig verschwunden. Im ganzen wurden 1.8200 g = 10.11 % Acetaldehyd gewonnen.

Mit einem etwas reichlicheren, aber an sich doch geringen Hefezusatz ist der Versuch 19 ausgeführt, der auf die ursprüngliche Hexosenmenge 210 % Sulfit enthielt.

Versuch 19. 17.1 g Rohrzucker wurden mit den Nährsalzen in 90 ccm Wasser gelöst und mit 3 g Bäckerhefe in Angärung versetzt. Nach Zugabe von 37.8 g sekundärem schwefligsauren Natrium in 180 ccm Wasser wurde ein Gesamtvolumen von 295 ccm herbeigeführt. Nach 3 Tagen fiel die Nitroprussidnatrium-Reaktion noch völlig negativ aus, die Ostsche Probe war dagegen außerordentlich stark positiv, ein Beweis, daß die Invertase in Tätigkeit getreten war, aber die zymatischen Fermente der kleinen Hefeaussaat durch das große Sulfitquantum und bei der hohen Konzentration geschädigt waren. Deshalb wurden 5 g Oberhefe nachgefüllt, die nunmehr nach 24 Stdn. bereits eine starke Aldehydbildung und im Verlauf von 22 Tagen eine vollständige Umsetzung des Zuckers zu Wege brachten.

Es wurde, wenn auch langsam, die hohe Ausbeute von insgesamt 3.2634 g Acetaldehyd = 18.13 % = 74.2 % der Theorie erreicht, und zwar mit einer bescheidenen Hefemenge.

Anwendung des Abfangverfahrens auf Vergärungen mittels Unterhefen.

Die höhere Empfindlichkeit der untergärigen Hefen gegen die Zusätze und die daraus folgende stärkere Abhängigkeit der Leistung von der absoluten Menge Unterhefe, sowie sonstige Abweichungen ergeben sich aus folgenden Ansätzen:

Versuch 20. 19 g Rohrzucker, entsprechend 20 g Hexosen, wurden in 160 ccm Wasser gelöst, nach erfolgter Angärung durch 5 g untergäriger Bierhefe¹⁾ mit einer Lösung von 15 g wasserfreiem Dinatriumsulfat in 65 ccm Wasser gemengt. Das Gesamtvolumen betrug 230 ccm. Als nach 9 Tagen das Reduktionsvermögen nicht weiter abnahm, wurde trotzdem der Versuch abgebrochen. Gewonnen wurden in toto 0.4805 g = 2.40 % Acetaldehyd.

Versuch 21. Der ganz entsprechende Ansatz mit 19 g Rohrzucker, aber mit einer noch etwas größeren Menge Dinatriumsulfat (20 g), ging noch weniger zu Ende und lieferte nur 0.2184 g Acetaldehyd = 1.09 %.

Ein besseres Ergebnis hatte die Verwendung einer größeren Hefenquantität im nächsten Ansätze.

Versuch 22. Hier gelangten zunächst 30 g untergärige Brauereihefe zur Einwirkung auf die Lösung von 42.75 g Rohrzucker (45 g Hexosen enthaltend) und 63 g Na_2SO_3 . Im Verlauf von 18 Tagen wurden im ganzen noch 90 g Unterhefe nachgegeben, wodurch die Zuckerreaktion nahezu zum Verschwinden gebracht wurde. Gefunden wurden insgesamt in der 1000 ccm betragenden Urlösung 6.5400 g Acetaldehyd = 14.53 %.

Erst mit sehr viel Unterhefe wurde also eine Leistung erzielt, wie sie der 10. Teil Oberhefe leicht und in 6-fach kürzerer Zeit vollbringt.

Die Wirksamkeit von schwefligsaurem Calcium als Abfangmittel bei der Vergärung mittels Unterhefen zeigt der Ansatz 23.

In Versuch 23 entfielen auf 19 g Rohrzucker 150 g wasserfreies Calciumsulfat bei einem Gesamtvolumen von 300 ccm. Die Zuckermenge vergor hier in Anwesenheit des so wenig schädlichen schwefligsauren Calciums bereits mit 3 g untergäriger Hefe (Rasse U) und schon in 2 Tagen, lieferte aber, weil dabei von einer besonderen mechanischen Verteilung durch Schütteln und Kohlendioxyd-Einleiten Abstand genommen war, nur 0.3939 g = 1.97 % Acetaldehyd.

Acetaldehyd und Glycerin werden auch von untergäriger Hefe im korrelativen Verhältnis erzeugt gemäß den Ergebnissen der Ansätze 24 und 25.

Versuch 24. 19 g Rohrzucker in 150 ccm Wasser wurden in Gegenwart der Nährsalze mit 20 g Unterhefe U (des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin) zur Angärung gebracht und dann mit einer Lösung von 20 g Na_2SO_3 in 70 ccm Wasser versetzt. Nach 4 Tagen wurden abermals 20 g Hefe zugegeben. Nach weiteren 7 Tagen wurde der Versuch abgebrochen, ob-

¹⁾ Mit dieser Bezeichnung vom Institut für Gärungsgewerbe geliefert.

gleich noch reichlich reduzierender Zucker vorhanden war; denn bei längerem Stehen trat bei den untergärigen Rassen leicht Fäulnis ein. Im ganzen wurden $0.4114 \text{ g} = 2.06 \%$ Aldehyd und $0.8593 \text{ g} = 4.29 \%$ Glycerin erhalten.

Etwa doppelt so hohe Ausbeute lieferte der Versuch 25, in dem die gleiche Hefemenge auf dieselbe Zuckerquantität, aber in Gegenwart von nur 15 g Dinatriumsulfit, zur Einwirkung kam. Auch hier wurde der Versuch vorzeitig, und zwar nach 11 Tagen abgeschlossen. Wir fanden in toto 1.0949 g Acetaldehyd $= 5.47 \%$ und 2.3030 g Glycerin $= 11.50 \%$.

Bei dieser Unterhefe erhielten wir das scheinbar paradoxe Resultat, daß eine größere Sulfitmenge eine kleinere Aldehyd- und Glycerin-Produktion bewirkt. Ein Grund für dieses Verhalten, das von dem der kräftigeren Oberhefen wesentlich abweicht, liegt in der geringeren Widerstandsfähigkeit der untergärigen Rasse.

Anwendung des Abfangverfahrens auf Vergärungen mittels Trockenhefen und Macerationssaft.

Durch die Behandlung, die bei der Herstellung von Trockenhefen stattfindet, gehen bekanntlich Veränderungen mit der Hefe vor, die ihr nach manchen Richtungen hin eine besondere Empfindlichkeit verleihen. Infolge Lockerung der Zellhüllen neigt die in den Trockenzustand versetzte Hefe besonders zur Autolyse. Dieses Verhalten tritt ganz augenfällig bei der Digestion von Trockenhefe mit alkalisch reagierenden Flüssigkeiten zu Tage. Trotzdem haben wir einige Versuche mit Dinatriumsulfit über die Festlegung der Acetaldehyd-Stufe bei der von Trockenhefen bewirkten Vergärung vorgenommen.

Versuch 26. In die Lösung von 8.55 g Rohrzucker in 50 ccm Wasser wurden 10 g Trockenhefe eingetragen und eine Lösung von 6.3 g Dinatriumsulfit in 50 ccm Wasser sowie 1 ccm Toluol hinzugefügt. Ein großer Teil der Hefentrockensubstanz verflüssigte sich rasch, obgleich die Digestion nur bei Zimmertemperatur erfolgte. Das Gemisch blieb 3 Monate lang unverändert stehen und enthielt dann insgesamt $0.1154 \text{ g} = 1.3 \%$ Acetaldehyd.

Versuch 27. Dieser Ansatz entsprach in seinen Mengenverhältnissen vollkommen dem vorangehenden bis auf die in Fortfall kommende Beigabe von Toluol; nach 8 Tagen wurden 10 g Trockenhefe nachgefüllt, da die erste Hefenportion stark autolytisch war. Auch die zweite Menge ging schnell größtenteils in Lösung und wurde nach weiteren 8 Tagen durch 5 g neue Trockenhefe ergänzt. Die Verarbeitung erfolgte nach 40 Tagen, obzwar noch reduzierender Zucker vorhanden war. Im ganzen haben wir $0.2970 \text{ g} = 3.3 \%$ Acetaldehyd festgestellt.

Versuch 28 lehrt von neuem, daß der Zusatz von Toluol zur Trockenhefe die Aldehyd-Ausbeute herabmindern kann im Falle der Verwendung des alkalisch reagierenden Dinatriumsulfits. Denn unter sonst gleichen Verhältnissen, aber mit 2 ccm Toluol, belief sich die Ausbeute nur auf $0.0684 \text{ g} = 0.76 \%$.

Die überlegene Brauchbarkeit des neutral reagierenden Calciumsulfits zeigt sich deutlich in den nachstehenden Versuchen.

Versuch 29. 9.5 g Rohrzucker wurden in 100 ccm Wasser gelöst und mit 25 g frisch bereitetem lufttrockenen Calciumsulfid sowie 10 g Trockenhefe versetzt. Nach 5 Std. war kräftige Gärung im Gange und deutliche Aldehyd-Reaktion in dem Destillat¹⁾ vorhanden, das man aus einigen Kubikzentimetern Gäransatz durch Einleiten von etwas Wasserdampf in Gegenwart von kohlen-saurem Calcium übergetrieben hatte. Nach 8 Tagen wurden noch 5 g Trockenhefe nachgefüllt, und nach 28 Tagen, während deren die Digestion bei Zimmertemperatur vorgenommen war, erfolgte die Aufarbeitung, obgleich in einer mit Mercuriacetat²⁾ von störenden stickstoff-haltigen Substanzen befreiten Probe noch Zucker nachweisbar war. Zum Schluß bestand infolge der mit der Autolyse einhergehenden Veränderungen eine schwach saure Reaktion auf Lackmus. Erhalten wurden im ganzen 0.4652 g Acetaldehyd = 4.65 %.

Versuch 30. Hier gelangten die gleichen Mengenverhältnisse wie im Gäransatz 29 zur Anwendung, jedoch unter Zugabe von 2 ccm Toluol. Verhalten und Eigenschaften waren dieselben. Die Aldehyd-Ausbeute betrug 0.2158 g = 2.16 % Acetaldehyd.

Im Vergleich mit Ansatz 28 ist der Ertrag ungefähr auf das Dreifache gesteigert — ein Hinweis darauf, daß die empfindliche Trockenhefe die doppelte Schädigung durch Toluol wie durch das Abfangmittel besser verträgt, wenn das letztere den neutralen Charakter des Calciumsulfits besitzt.

Des weiteren haben wir geprüft, ob auch bei Verwendung von Trockenhefe neben dem gebildeten Acetaldehyd Glycerin im korrelativen Verhältnis auftritt. Vorproben hatten uns zwar gezeigt, daß die Trockenhefe an sich zu solchen Versuchen weniger geeignet ist, da sie nicht unerhebliche Mengen von Glycerin abgibt, wohl infolge der starken Autolyse, bei der Fette und Phosphatide gespalten werden.

Versuch 31. In die Lösung von 19 g Rohrzucker (= 20 g Hexosen) in 300 ccm Wasser wurden 100 g wasserfreies schwelligsaures Calcium, 20 g Trockenhefe sowie 3 ccm Toluol eingetragen. Als nach 10 und 20 Tagen noch reichlich Zucker vorhanden war, wurden jedesmal noch 20 g Trockenhefe hinzugefügt. Nach 2-monatlicher Digestion erfolgte Verarbeitung trotz andauernder Gegenwart unveränderten Zuckers. Im ganzen erhielten wir 0.1028 g = 0.52 % Aldehyd. Ihm standen 0.6860 g Glycerin gegenüber; von dieser Menge ist jedoch das Quantum abzuziehen, das bei gleich lange ausgedehnter Autolyse dieselbe Menge Trockenhefe für sich lieferte. Diese Quantität war 0.4076 g. Die der entwickelten Aldehyd-Menge entsprechende Glycerin-Ausbeute ist also 0.2784 g = 1.39 % Glycerin.

¹⁾ Die unmittelbare Anstellung der Nitroprussidnatrium-Probe ist in Gäransätzen mit Trockenhefen oder Macerationssäuren wegen der störenden Sulfhydryl-Reaktion in Lösung gegangener Eiweißabkömmlinge unsicher.

²⁾ C. Neuberg, „Der Harn“, S. 333.

Wie man sieht, werden auch hier Acetaldehyd und Glycerin angenähert im molekularen Verhältnis gebildet.

Übrigens entstanden bei der Selbstgärung der benutzten Trockenhefe, obgleich doch frische Hefen¹⁾ bei einfacher Digestion Aldehyd hervorbringen können, keine quantitativ in Betracht kommenden Mengen Acetaldehyd.

Calciumsulfid bewährt sich als Abfangmittel nicht nur bei Trockenhefen, sondern auch bei dem aus diesen bereiteten Macerationsaft.

In Versuch 32 und 33 benutzten wir 250 ccm frischen Macerationsaft, in dem 23.75 g Rohrzucker gelöst waren; hinzugegeben wurde bei Versuch 32 das aus 12.5 g Na_2SO_3 und bei Versuch 33 das aus der doppelten Menge Dinatriumsulfid bereitete Quantum schwelligsauren Calciums. In beiden Fällen geschah die Digestion unter Zugabe von 3 ccm Toluol 12 Tage lang bei Zimmertemperatur; zu diesem Zeitpunkte waren zwar noch 60% Zucker unverbraucht, doch erfolgte die Aufarbeitung. Sie wies für Versuch 32: $0.2880 \text{ g} = 1.16\%$ Acetaldehyd und für 33: $0.5185 \text{ g} = 2.07\%$ Aldehyd aus. Für den wirklich umgesetzten Zucker berechnet sich daraus die Ausbeute für Ansatz 32 zu 2.90%, für Ansatz 33 zu 5.18%.

Verhalten der Triosen.

Versuch 34. 3 g krystallisiertes Dioxyceton waren mit den Nährsalzen in 150 ccm Wasser gelöst und dazu die aus 90 g wasserfreiem Dinatriumsulfid bereitete Menge Calciumsalz sowie 5 g Bäckerhefe²⁾ gefügt. Mit Wasser wurde ein Volumen von 330 cm hergestellt. Nach 4 Tagen, d. h. nach einer Zeit, innerhalb derer die wirklich gärenden 6-Kohlenstoffzucker vollständig verschwunden sind, reduzierte das Gemisch Fehlingsche Lösung noch ohne Erwärmung und zeigte gerade die Andeutung einer Nitroprussidnatrium-Reaktion. Letztere nahm dann allmählich zu und war nach 14 Tagen kräftig geworden, während sich unveränderte Triose noch immer durch die Reduktion von alkalischer Kupferlösung in der Kälte zu erkennen gab. Das blieb so trotz erneuten Zusatzes von 5 g Hefe bis zur Aufarbeitung, die nach 3 Wochen vorgenommen wurde. Dieselbe ergab insgesamt $0.1007 \text{ g} = 3.36\%$ Acetaldehyd.

Versuch 35 war genau in derselben Weise angesetzt, nur mit dem Unterschiede, daß statt des unlöslichen Calciumsulfids 2.4 g reines Dinatriumsulfid zur Einwirkung kamen. Acetaldehyd stellte sich gleichfalls ein, aber das Reduktionsvermögen blieb auch hier sehr stark, viel unveränderten 3-Kohlenstoffzucker anzeigend, obgleich sowohl nach 8 wie nach 14 Tagen 5 g Oberhefe nachgefüllt waren. Bei Abbruch des Versuches waren 0.1525 g Acetaldehyd $= 5.08\%$ gebildet.

¹⁾ C. Neuberg und J. Kerb, B. 47, 2730 [1914]; C. Neuberg und E. Schwenk, Bio. Z. 71, 126 [1915].

²⁾ Die normale Wirksamkeit der Hefen auf die Zymohexosen wurde hier und in allen anderen Versuchen mit den 3-Kohlenstoffzuckern jedesmal besonders festgestellt.

Wir haben uns in zahlreichen Variationen bemüht, mit dem Dioxy-aceton beweisendere Ergebnisse zu erzielen. Die Versuche mit Heranziehung von Dinatriumsulfid, das ja hinsichtlich des erreichbaren Umfanges der Aldehyd-Festlegung dem Calciumsulfid überlegen ist, mußten überhaupt aufgegeben werden, da bei der Alkalinität sowie der notwendigen langen Versuchszeit, in der die Triose nur zum kleinsten Teile umgesetzt wurde, häufig Kahmhefen oder auch Bakterien hochkamen. Wir haben viel derartige Ansätze durch diese Empfänglichkeit für Infektionen verloren. Die Heranzüchtung einer genügenden Hefemenge in der Lösung der 3-Kohlenstoff-Zucker selbst stieß aber auf unüberwindliche Schwierigkeiten. Ein wenig glatter schienen die Versuche mit schwefligsaurem Calcium zu verlaufen, aber sie fielen in quantitativer Hinsicht ganz unbefriedigend aus. Deshalb mußten wir schon in den vorangestellten Betrachtungen hervorheben, daß eine intermediäre Entstehung von Dioxy-aceton — und das selbe gilt in erhöhtem Maße vom isomeren Glycerinaldehyd — nicht angenommen werden kann. Wir führen einige dieser Versuche an.

Versuch 36. 9.0 g Dioxy-aceton wurden in 500 ccm Wasser zusammen mit den Nährsalzen gelöst und eine Suspension von Calciumsulfid hinzugefügt, das aus 126 g wasserfreiem Na_2SO_3 gewonnen war. Dann wurde ein Volumen von 1080 ccm unter gleichzeitiger Zugabe von 5 g Oberhefe hergestellt. Nach 6 Tagen trat positive Aldehyd-Reaktion auf. Sie wurde allmählich etwas deutlicher, ohne daß der reduzierende 3-Kohlenstoff-Zucker verschwand oder auch nur wesentlich abnahm, obgleich jedesmal nach Ablauf einer Woche noch 4-mal 5 g Hefe hinzugefügt worden waren. Die Verarbeitung geschah nach 44 Tagen und ergab im ganzen 0.4160 g = 4.62 % Acetaldehyd.

Die äquivalente Acetaldehyd- und Glycerin-Bildung vollzieht sich mittels Oberhefen unter quantitativem Umsatz der 6-Kohlenstoff-Zucker; man mußte also, falls Triosen dabei die Durchgangsstufe bilden, ein entsprechendes Verhalten derselben erwarten. Das Experiment hat das Gegenteil ergeben. Deshalb haben wir auch untergärrige Hefe und untergärrige Trockenhefe herangezogen, der Möglichkeit Rechnung tragend, daß vielleicht diese Rassen das erwähnte Substrat besser verarbeiten könnten. Diese Hoffnung hat sich jedoch auch nicht erfüllt.

Versuch 37. 9.0 g Dioxy-aceton wurden mit der gewaltigen Menge von 80 g Hefe U, sowie mit 120 g lufttrockenem schwefligsaurem Calcium unter Herstellung eines Volumens von 740 ccm 12 Tage lang digeriert. Die Gesamtausbeute an Aldehyd betrug 0.3790 g = 4.21 %.

Wir übergangen eine Reihe von Versuchen mit geringerem Hefenzusatz sowie stärkerer Triosen-Konzentration; dabei fielen die Aldehyd-Erträge noch spärlicher aus. Angeführt seien bloß die

Versuche 38 und 39, in denen Trockenhefe benutzt wurde. Von dieser gelangten zunächst 20 g in Gegenwart von 2 ccm Toluol auf die Lösungen von 9.0 g Dioxy-aceton in 200 bzw. in 900 ccm Wasser mit 90 g Calciumsulfid zur Einwirkung. Nach 8 und 14 Tagen wurden je 30 g Trockenhefe nachgefüllt. Trotzdem war nach 3 Wochen noch reichlich unverändertes Dioxy-aceton zugegen und Acetaldehyd nur in einer Menge von 0.87 % resp. 0.73 % vorhanden.

Die erwähnte starke Neigung zu Infektionen zusammen mit den geringen Aldehyd-Ausbeuten in den beiden mit Toluol sterilisierten Ansätzen bestärken uns in einer vorsichtigen Beurteilung der Verhältnisse bei den Triosen, namentlich hinsichtlich des Vorganges, durch den diese kleine Acetaldehydmenge entstand.

Aber selbst jene bescheidenen Erträge an Acetaldehyd haben wir in ganz entsprechenden Ansätzen mit Glycerinaldehyd nicht verzeichnen können. Wir haben nur Spuren beobachtet und nehmen daher von einer Wiedergabe im einzelnen Abstand. Die Versuche versprachen schon deswegen einen nur geringen Erfolg, weil wir hatten feststellen müssen, daß keine der uns zur Verfügung stehenden ober- und untergärigen Hefenrassen die $\frac{1}{2}$ - bis 1-proz. Lösungen dieser Aldotriose zu vergären vermochte. Durch vergleichende Ansätze mit Traubenzucker-Lösungen derselben Konzentration und durch kombinierte Versuche, in denen Hexose und Triosen zusammen rd. 48 Stunden der Einwirkung der Hefen ausgesetzt waren, hat sich ergeben, daß in der Zeit, in der die Hexosen-Gärung quantitativ abläuft, Glycerinaldehyd praktisch gar keine und Dioxy-aceton eine unbedeutende Veränderung erfuhr. Eine solche setzte erst allmählich bei längerer Digestion mit den Hefen ein, blieb aber auch dann geringfügig, da das Reduktionsvermögen gegen alkalische Kupferlösung in 6—8 Tagen nur um 10—20 % abnahm.

Die Vergärbarkeit von Brenztraubensäure in Gegenwart von Sulfit

läßt sich sehr schön auf folgende Weise zeigen:

Versuch 40. 2.0 g Brenztraubensäure wurden in 66 ccm Wasser gelöst und durch Schütteln in der Kälte mit kohlsaurem Calcium neutralisiert. Die vom Überschuß des letzteren abfiltrierte und durch Auswaschen des CaCO_3 quantitativ erhaltene Lösung des Calcium-pyruvins wurde mit Wasser auf 200 ccm gebracht und tropfenweise zu einer Aufschwemmung von 25 g Hefe OM sowie 30 g CaSO_3 in 50 ccm H_2O gesetzt. Nach 58 Stunden wurden durch Wasserdampf-Destillation in Gegenwart von kohlsaurem Calcium 0.5484 g = 27.4 % Acetaldehyd gewonnen, was 54.8 % der theoretisch möglichen Menge ausmacht. In einem Kontrollversuch auf Selbstgärung wurde dieselbe Hefenmenge gleichfalls in 250 ccm Wasser suspendiert und mit Calciumsulfit 48 Stunden digeriert. Erhalten wurden im ganzen 0.0103 g Acetaldehyd, also eine Menge, die verschwindend ist im Vergleiche mit dem Ergebnis des Brenztraubensäure-Versuches und daher vernachlässigt werden kann.

Das Calciumsulfit ist also auch geeignet zur Feststellung der Gärfähigkeit von Brenztraubensäure in Gegenwart von schwefligsauren Salzen; unter diesen Bedingungen führt der Zerfall der Brenztraubensäure oder richtiger ihrer Sulfitverbindung zu Kohlensäure und dem Acetaldehyd-Sulfit-Komplex.

Anhangsweise

beschreiben wir eine Versuchsanordnung, die Anwendung und Wirkungsart des Abfangverfahrens in wenigen Minuten vorzuführen gestattet.

Wir geben der Demonstration die Gestalt eines Vorlesungsexperimentes und erteilen ihm ungefähr dieselbe Form, die wir vor Jahren für die analoge Veranschaulichung¹⁾ der Brenztraubensäure-Gärung gewählt haben.

In 20 ccm einer 10-proz. Lösung von Rohr- oder Traubenzucker, die sich in einem weiten Reagensglase befinden, werden 2 g Calciumsulfit ($\text{CaSO}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$) und 2 g Preßhefe durch Schütteln gleichmäßig verteilt. Das Gemisch wird in ein Gärröhrchen eingefüllt, dessen kurzer offener Schenkel durch eine Schlauchverbindung mit einem aufwärts ragenden Glasrohr verlängert ist. Gleichzeitig setzt man eine Kontrollprobe an, zu der 20 ccm 10-proz. Zuckerlösung nur mit Hefe (ohne Sulfit) verwendet werden. Beide Gefäße werden alsdann in ein Becherglas versenkt, das mit Wasser von 38—40° gefüllt ist und über dessen Oberfläche die erwähnten Verlängerungsstücke der Gärröhrchen emporragen. In beiden Proben beginnt alsbald die Entwicklung von Kohlensäure, die in der sulfithaltigen Probe gewöhnlich etwas schwächer ist. Nach $\frac{1}{4}$ Stunde kann man in der letzteren bereits das Auftreten von Acetaldehyd mit aller Schärfe nachweisen. Zu diesem Zwecke werden 3 ccm des Inhalts mit einer Pipette entnommen und ohne Filtration mit $\frac{1}{2}$ ccm 4-proz. Nitroprussidnatrium-Lösung sowie mit 2—3 ccm 3-proz. Piperidin-Lösung versetzt. Es stellt sich die für den Acetaldehyd charakteristische tiefe Blaufärbung ein. Die sulfitfreie Kontrollprobe wird nach Zugabe von Nitroprussidnatrium und Piperidin dagegen nicht gebläut. Dehnt man den Versuch auf $\frac{1}{2}$ Stunde aus, so wird die Reaktion in der sulfithaltigen Probe noch sehr viel stärker, während die Kontrollprobe negativ bleibt.

Der Versuch, der in beliebig vergrößertem Maßstabe vorgenommen werden kann, mißlingt niemals. Er kann mit gärkräftiger obergäriger oder untergäriger Hefe, auch mit käuflicher Bäckerhefe angestellt werden. Bedingung ist die Brauchbarkeit des schwefligsauren Calciums, das man am besten selbst bereitet (s. S. 1690).

So kann man die Grundlage, auf der sich die Ergebnisse der neuen Methodik aufbauen, die Festlegung der Acetaldehyd-Stufe bei der alkoholischen Gärung, bequem als Vorlesungsversuch vorführen.

¹⁾ C. Neuberg und L. Karczag, B. 44, 2477 [1911].