

**201. Johannes Kerb: Über den Verlauf der alkoholischen Gärung bei Gegenwart von Kohlensäurem Kalk.**

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

(Eingegangen am 29. Juli 1919.)

Vor 7 Jahren haben C. Neuberg und ich<sup>1)</sup> gezeigt, daß bei der Vergärung von Brenztraubensäure mit lebender Hefe reichlich Äthylalkohol gebildet wird. Derselbe entsteht aus dem primär auftretenden Acetaldehyd, den das Hefenferment Carboxylase aus der Brenztraubensäure erzeugt. Die Bildung des Äthylalkohols erfolgt in besonders beträchtlichem Maße bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glycerin. Diese Befunde bildeten die Grundlage für die von Neuberg und mir aufgestellte Theorie der alkoholischen Gärung<sup>2)</sup>, gemäß welcher Brenztraubensäure und Acetaldehyd Zwischenstufen bzw. Acetaldehyd und Glycerin Nebenprodukte der alkoholischen Zuckerspaltung sind. Als Stütze dieser »Brenztraubensäure-Theorie der Gärung« dienten folgende Tatsachen:

Die Brenztraubensäure wird von allen zuckervergärenden Hefen zerlegt, und zwar mit größerer Schnelligkeit als der Zucker, zeigt also ein Verhalten, das von einem Zwischenprodukt zu verlangen ist. Trockenhefen sowie Hefepreß- und Macerationssäfte vergären die Brenztraubensäure und ihre Salze gleichfalls mit Leichtigkeit, und die Temperaturgrenzen sowie die noch in deutlicher Weise wirksamen kleinsten Fermentmengen fallen für das zuckerspaltende Ferment Zymase und das Brenztraubensäure zerlegende Enzym Carboxylase praktisch zusammen. Hinzu kommt, daß die Brenztraubensäure für die Hefe eine abnorme Ungiftigkeit aufweist, die weit geringer ist, als nach ihrer hohen Dissoziationskonstante ( $5.6 \cdot 10^{-1}$ ) zu erwarten ist. Das deutet auf eine natürliche Rolle dieser Substanz im Dasein der Hefe hin. Wo sonst in der Natur zymase-artige Wirkungen zu Tage treten, z. B. in den Organen niederer und höherer Pflanzen, wie bei Schimmelpilzen, Kartoffeln, Lupinen usw., ist stets auch das Brenztraubensäure spaltende Ferment, die Carboxylase, nachweisbar.

<sup>1)</sup> C. Neuberg und Joh. Kerb, B. 46, 2225 [1913]; Ztschr. f. Gärungsphysiol. 1, 114 [1912].

<sup>2)</sup> C. Neuberg und Joh. Kerb, Bio. Z. 58, 158 [1913].

Indem ich wegen der Herleitung der Brenztraubensäure aus dem Molekül des Zuckers auf unsere früheren Ausführungen verweise, möchte ich nur hervorheben, daß die Brenztraubensäure eine verständliche Beziehung zur Gärungs-Kohlensäure einerseits, zum Äthylrest des Weingeistes andererseits herstellt. Alle früher vorübergehend als Zwischenprodukte angesehenen Substanzen (insbesondere Milchsäure, Dioxy-aceton und Glycerinaldehyd) mußten wegen mangelnder oder ungenügender bezw. anders gearteter Vergärbarkeit wieder außer Betracht bleiben. Dagegen ist in der Brenztraubensäure der Carboxylrest und auch die Äthylgruppe präformiert, indem der durch die fermentative Spaltung so besonders glatt entstehende Acetaldehyd durch die biologischen Agenzien auch leicht in Äthylalkohol selbst übergeführt wird.

Einen direkten experimentellen Beweis für die Brenztraubensäure-Acetaldehyd-Hypothese haben neuerdings C. Neuberg und E. Reinfurth<sup>1)</sup> geliefert, indem es ihnen mit Hilfe der von ihnen angegebenen »Abfangmethode« gelungen ist, Acetaldehyd bei der Vergärung des Zuckers in Mengen bis zu 75 % der Theorie zu fixieren. Ein Stoff, der in solcher erheblichen Menge mit Hilfe des erwähnten Kunstgriffes (Zusatz von sekundären Sulfiten) festgelegt werden kann, muß natürlich als ein Zwischenprodukt gelten. Mit Hilfe der Abfangmethode gelingt es jedoch nicht, die unmittelbare Vorstufe des Acetaldehyds, die Brenztraubensäure selbst, zu fesseln, da sie auch unter den Bedingungen des Abfangverfahrens durch die Carboxylase gespalten wird.

Es findet sich nun die außerordentlich auffallende Angabe in der Literatur, daß die Brenztraubensäure in recht einfacher Weise und in beträchtlicher Ausbeute bei der Vergärung des Zuckers lediglich in Anwesenheit von kohlensaurem Kalk erhalten werden könne. Diese Behauptung haben A. Fernbach und M. Schön<sup>2)</sup> aufgestellt. Sie geben an, daß bei der Vergärung von Glucose oder Invertzucker in Gegenwart der üblichen Nährsalze und von überschüssigem Calciumcarbonat mittels Myko- oder Champagnerhefe zum Schluß durch Alkohol fällbare Calciumsalze zugegen seien (25 % vom Gewichte des angewendeten Zuckers), die bis mehr als zur Hälfte (51.92 %) brenztraubensaures Calcium einschließen sollen. Die französischen Autoren haben ihre Behauptung in der 2. Mitteilung dahin erweitert, daß auch andere Hefen sich ebenso verhalten. Die Veröffentlichung von Fernbach und Schön sind nun insofern verwunderlich, als brenztraubensaures Calcium ebenso wie jedes andere

<sup>1)</sup> C. Neuberg und E. Reinfurth, Bio. Z. 89, 365 [1918].

<sup>2)</sup> A. Fernbach und M. Schön, C. r. 157, 1478 [1913]; 158, 1718 [1914].

Salz der Brenztraubensäure und die freie Säure selbst glatt vergärbbar ist. Dieser Punkt ist von den Autoren ganz außer acht gelassen, und es fehlt jede Erklärung, wieso das leicht vergärbare Zwischenprodukt sich anhäufen soll. Dieser Widerspruch ist mir Veranlassung gewesen, mit deutschen Hefen die Angabe der genannten Autoren nachzuprüfen; denn sie bietet für das Gärungsproblem ersichtlicher Weise ja nur dann ein Interesse, wenn sie mit den typischen Erregern der alkoholischen Zuckerspaltung und nicht mit einigen Spezialmikroben verwirklicht werden kann. Den experimentellen Daten vorgehend, will ich bemerken, daß mir in zahlreich darauf gerichteten Versuchen in keinem Falle auch nur ein qualitativer Nachweis von Brenztraubensäure bei der Vergärung von Zucker in Gegenwart von Calciumcarbonat gelungen ist. Verarbeitet man nach den Angaben der genannten Autoren das Gärgut auf die mittels absoluten Alkohols fällbaren löslichen Kalksalze, so ist es unmöglich — weder durch die Reaktion mit Phenylhydrazin, noch mit *p*-Nitrophenylhydrazin, noch durch die so außerordentlich feine Nitroprussidnatrium-Probe, welche die Brenztraubensäure und ihre Salze in einer Konzentration von 1:10000 nachzuweisen gestattet —, auch nur eine Spur Brenztraubensäure aufzufinden. Das Gemisch der ausgefällten Kalksalze bestand vielmehr aus Gips und Calciumphosphat (den angewendeten Nährsalzen bezw. der Hefe entstammend), sowie aus Calciumcarbonat (aus dem in Lösung gegangenen Bicarbonat herrührend), ferner aus dem Calciumsalz der Essigsäure, die schon bei normalen Gärungen in Spuren auftritt und in erhöhtem Maße bei Abstumpfung der natürlichen sauren Reaktion<sup>1)</sup> durch die reichlichen Mengen des kohlensauren Kalkes produziert wird. Außerdem war die Alkohol-Ausbeute, die doch bei der von den französischen Autoren behaupteten Bildung von 13 % Brenztraubensäure aus dem angewendeten Zucker sehr erheblich hätte herabgesetzt sein müssen, in den vergleichenden Versuchen mit und ohne Calciumcarbonat praktisch gleich. Die ganz geringen Unterschiede finden in doppelter Weise ihre Erklärung. Einmal dürfte für die Ernährung der Hefe unter den ungünstigen Bedingungen, d. h. in dem ungewohnten, durch Calciumcarbonat hergestellten neutralen Milieu, ein etwas höherer Zuckerverbrauch erforderlich sein, so daß der Alkohol-Ertrag um ein Geringes sich erniedrigen muß; andererseits wird das unbedeutende Defizit gedeckt durch die oben erwähnte Bildung von Essigsäure sowie durch eine Erhöhung des Aldehyd-Gehaltes. Der aus den Gäransätzen mit Calciumcarbonat erhaltene Wein-

<sup>1)</sup> C. Neuberg und I. Hirsch, Bio. Z. 96, 175 [1919].

geist enthielt nämlich eine über die Norm deutlich gesteigerte Menge Acetaldehyd, der nach den Feststellungen von Neuberg mit Färber<sup>1)</sup> sowie Hirsch<sup>2)</sup> ja stets durch Verschiebung der natürlichen sauren Hefereaktion auftritt, d. h. wenn durch Zusatz Essigsäure bindender Mittel die üblicherweise bei der Hefengärung herrschende Acidität aufgehoben wird.

Es fragt sich nun, wie wohl die abweichenden Ergebnisse von Fernbach und Schön zu deuten sind. M. W. Beijerinck und T. Folpners<sup>3)</sup> haben gezeigt, daß zahlreiche Mikroorganismen existieren, welche Milchsäure, Äpfelsäure, Alanin, Asparaginsäure usw. zu Brenztraubensäure oxydieren, ohne sie weiter anzugreifen. P. Mazé und M. Ruot<sup>4)</sup> haben diese Angaben bestätigt und durch den Nachweis erweitert, daß atmosphärischer Sauerstoff für diese Art von Brenztraubensäure-Bildung, die eben einen Oxydationsvorgang darstellt, unerlässlich ist, während sich die alkoholische Zuckerspaltung bekanntermaßen anaerob vollzieht. Man wird sich unschwer vorstellen können, daß die durch Gegenwart von kohlen saurem Kalk bekanntermaßen so außerordentlich begünstigte Milchsäure-Gärung vorausgegangen ist und es sich um eine sekundäre Oxydation so erzeugten Lactates gehandelt hat. In Betracht zu ziehen ist aber vielleicht auch, daß die von den französischen Autoren benutzten Gärungserreger überhaupt der Klasse der eigentlichen Kulturhefen ferner stehen. Der Beschreibung der Autoren ist nicht zu entnehmen, ob sie die Gärung in üblicher Weise durch ein hinreichendes Quantum von Mikroorganismen eingeleitet oder lediglich eine spärliche Aussaat eingepft haben. Letzteres ist zu vermuten, da sie nur von einer Kultur sprechen. Es ist nicht von der Hand zu weisen, daß unter diesen ungewöhnlichen Gärbedingungen fremde, säurebildende Erreger die Überhand gewinnen. Ich habe mit wechselnden Hefequanten gearbeitet und bin bis zu einer solchen Menge herabgegangen, bei der noch eine vollständige Vergärung des Zuckers mit Sicherheit eintrat.

Meine Ergebnisse fasse ich folgendermaßen zusammen:

1. Bei Gegenwart von kohlen saurem Kalk verläuft die alkoholische Zuckerspaltung durch obergärige und untergärige Hefe hinsichtlich der Alkohol-Ausbeute normal.

2. Brenztraubensäure, die schon auf Grund des Alkohol-Ertrages nicht in nennenswerter Menge gebildet sein konnte, war auch nicht spurenweise qualitativ nachzuweisen.

3. Als einzige Wirkung des kohlen sauren Kalkes wurde eine unbedeutende Steigerung der Aldehyd-Menge sowie eine Zunahme der flüchtigen Säuren (Essigsäure) festgestellt.

<sup>1)</sup> C. Neuberg und E. Färber, *Bio. Z.* 78, 238 [1916].

<sup>2)</sup> Siehe Fußnote 1 auf S. 1797.

<sup>3)</sup> M. W. Beijerinck und T. Folpners, *Koninkl. Akad. van Wetenschap. Amsterdam* 18, 1198 [1916].

<sup>4)</sup> P. Mazé und M. Ruot, *C. r. soc. biolog.* 78, 706 [1916]; 79, 336 [1917].

Die folgenden Versuche wurden mit ober- und untergäriger Preßhefe, Rasse XII und U des Institutes für Gärungsgewerbe in Berlin, ausgeführt. Die Menge derselben schwankte zwischen 10 und 5 %<sup>1)</sup> vom Gewichte des angewendeten Zuckers. Dieser selbst wurde in einer keimfreien Nährflüssigkeit gelöst, die genau nach den Angaben der französischen Autoren bereitet war und folgende Nährsalze im Liter enthielt: 2 g  $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4$ , 0,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,4 g  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , ferner Spuren von Zinksulfat, Eisensulfat und Kaliumsilicat. Die Menge des zugesetzten kohlensäuren Kalkes betrug in allen Fällen 100 g auf 90 g Ausgangsmaterial (Rohrzucker). Diese Zuckermenge war in 1,2 l Wasser bzw. sterilisierter Nährflüssigkeit gelöst. Die Gärtemperatur lag bei 28—30°. Unter diesen Verhältnissen goren die Ansätze auch in Gegenwart von Kreide nach 3—4 Tagen aus. Bei einer Verringerung der Hefenmenge auf 1 % (ca. 0,2 % trockne Hefe) war dagegen keine vollständige Vergärung in den  $\text{CaCO}_3$ -haltigen Ansätzen zu erzielen — es blieb reichlich reduzierender Zucker auch bei Ausdehnung der Versuche auf 14 Tage übrig —, während die in allen Fällen ohne Calciumcarbonat angestellten Kontrollen stets zu Ende gingen. Zur Untersuchung der gebildeten löslichen Calciumsalze wurde die entgeistete und filtrierte Flüssigkeit bei ca. 30—35° eingeeengt und dann mit überschüssigem absolutem Alkohol versetzt. Die so erhaltene Kalksalzmenge schwankte in den einzelnen Ansätzen zwischen 1,3 und 3,0 g aus 90 g Rohrzucker, war also nicht im entferntesten so groß wie bei Fernbach und Schön. Neben den zuvor erwähnten anorganischen Körpern war nur Essigsäure, aber keine Spur Brenztraubensäure nachzuweisen. Zur Prüfung auf letztere dienten mit negativem Ergebnis die Nitroprussidnatrium-Reaktion sowie die Proben mit Phenyl- und *p*-Nitrophenylhydrazin, die mit der filtrierten konzentrierten wäßrigen Lösung der Kalksalze vorgenommen wurden. Mit ammoniakalischer Silberlösung gab letztere eine geringe Gelbfärbung, während Brenztraubensäure noch in erheblichster Verdünnung Schwarzfärbung bzw. einen Silberspiegel liefert. In mehreren Fällen wurde durch Destillation mit verdünnter Schwefelsäure bzw. Phosphorsäure aus dem Kalksalz-Gemisch flüchtige organische Säuren übergetrieben und in Form des Silbersalzes, das schwer löslich und nahezu weiß gefärbt war, bestimmt. Es zeigte sich, daß fast reines essigsäures Silber vorlag. Die Menge des so gewonnenen Acetats blieb jedoch zurück hinter der wirklich entstandenen, da ein Teil des essigsäuren Calciums der Alkohol-Fällung entgeht. Destilliert man die konzentrierte wäßrige

<sup>1)</sup> Berechnet auf Trockensubstanz rund 2 und 1 %.

Lösung der Kalksalze vor der Ausfällung durch Alkohol mit verdünnter Mineralsäure, so erhält man eine größere Menge flüchtiger Säure, die gleichfalls nahezu reine Essigsäure darstellt.

Der Acetaldehyd-Gehalt des Alkohols wurde mit Hilfe der Riminischen Reaktion festgestellt; sie war in den calciumcarbonatfreien Kontrollversuchen angedeutet, in den  $\text{CaCO}_3$ -haltigen Ansätzen ausnahmslos deutlich bezw. stark. Das Calciumcarbonat wirkt demnach ähnlich den Alkalien. Wie bereits Neuberg und Färber<sup>1)</sup> gezeigt und A. Oelsner und A. Koch<sup>2)</sup> bestätigt haben, entsteht beispielsweise unter dem Einflusse von Natriumcarbonat eine vermehrte Menge Gärungs-Acetaldehyd.

Einen Auszug aus den erhaltenen Resultaten gebe ich in Form der folgenden Übersichtstabelle wieder:

### A. Versuche mit obergäriger Hefe.

Alkohol-Ausbeute aus 90 g Zucker:

	ohne $\text{CaCO}_3$		mit $\text{CaCO}_3$		Bemerkung
mit 4.5 g Hefe	a) 42.80	b) 41.63	c) 42.02	d) 42.00	in c) 0.75 g Essigsäure,
» 9.0 »	e) 43.12	—	f) 42.60	—	» f) 1.26 »

### B. Versuche mit untergäriger Hefe.

Alkohol-Ausbeute aus 90 g Zucker:

	ohne $\text{CaCO}_3$		mit $\text{CaCO}_3$		Bemerkung
mit 4.5 g Hefe	g) 43.24	h) 43.44	i) 42.68	k) 42.88	in k) 0.97 g Essigsäure.
» 9.0 »	l) 40.46	—	m) 42.00	—	

## 202. Burckhardt Helferich: $\gamma$ -Oxy-aldehyde. (II.)

[Aus dem Chem. Institut der Universität Berlin.]

(Eingegangen am 7. August 1919.)

Vor einigen Monaten wurde in der ersten Arbeit<sup>3)</sup> über den  $\gamma$ -Oxy-valeraldehyd gezeigt, daß auf Grund der Molekularrefraktion dem Aldehyd (I.) sowohl wie seinem dort beschriebenen Acetylderivat (II.) und Methylderivat (III.) die vom Furan sich ableitenden Cycloformeln zuzuschreiben sind.

<sup>1)</sup> l. c.    <sup>2)</sup> A. Oelsner und A. Koch, H. 104, 180 [1919].

<sup>3)</sup> B. 52, 1123 [1919].