

Ein- wirkungs- dauer	Angewandt				Gefundenes Acetylen	
	Gesamt- volumen	Kohlen- säure	Acetylen		ccm	Vol.-%
Min.	ccm	%	ccm	Vol.-%		
15	3650	ohne CO ₂	3.52	0.096	2.4	0.06
10	3650	» »	3.53	0.096	3.15	0.086
5	3650	» »	3.21	0.087	2.9	0.079
4	3650	» »	2.56	0.070	1.79	0.049
15	2358	25	3.25	0.138	3.33	0.144
15	3650	10	4.07	0.111	4.13	0.112
15	3650	5	1.73	0.047	1.68	0.046
15	3650	5	3.06	0.083	3.08	0.084

Da diese Feststellungen jedoch nur an Luftgemischen mit 0.04—0.15% Acetylen gemacht worden sind, empfehlen wir, um sicher zu gehen, bei Untersuchungen von acetylen-haltigen Luftgemischen mit einem Zusatz von 10—20% Kohlensäure zu arbeiten.

10. April 1920.

122. Carl Neuberg und Elsa Reinfurth: Über die Vergärbarkeit der Brenztraubensäure unter den Bedingungen des Abfangverfahrens.

(Vergärung der Pyruvinat-Sulfite durch Hefe.)

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

(Eingegangen am 22. April 1920.)

Die Acetaldehyd-Brenztraubensäure-Theorie der Gärung¹⁾ darf als der am meisten befriedigende Ausdruck der zymochemischen Tatsachen gelten, besonders seitdem mit Hilfe des Abfangverfahrens (der Festlegung von Durchgangsstufen mittels schwelligsaurer Salze) der Acetaldehyd in bedeutender Menge, bis 75% der Theorie, als Zwischenprodukt nachgewiesen worden ist²⁾. Von französischen Autoren ist angegeben worden³⁾, daß man durch einfachen Zusatz von kohlensaurem Calcium auch die Brenztraubensäure festhalten könne; aber leider war es nicht möglich,

¹⁾ C. Neuberg, Monogr., Jena 1913.

²⁾ C. Neuberg und E. Färber, Bio. Z. 78, 238 [1916]; C. Neuberg und E. Reinfurth, Bio. Z. 89, 365 [1918].

³⁾ A. Fernbach und M. Schön, C. r. 157, 1478 [1913]; 158, 1718 [1914].

dies bei der Zuckerspaltung durch deutsche Hefen zu bestätigen¹⁾. Diese vergären nämlich alle die Brenztraubensäure mit größter Leichtigkeit zu Acetaldehyd und Kohlendioxyd; jene Behauptung würde also höchstens für gewisse Spezialhefen (Champagne- und Mykodermahefe) zutreffen können. Außer dem von unsausführlich beschriebenen Verhalten der Brenztraubensäure bei den eigentlichen Gärungsvorgängen enthüllen jedoch noch andere Eigenschaften dieser Säure ihre nahe biochemische Beziehung zum Zucker, die gerade im Hinblick auf diese Gärfähigkeit der Brenztraubensäure untersucht worden ist.

So zeigte Paul Mayer²⁾, daß brenztraubensaures Natrium im Organismus des normal ernährten Kaninchens zur Bildung von Glykose Anlaß gibt, die in erhöhter Menge im Blut auftritt und im Harn ausgeschieden wird. Derselbe Autor stellte am Hungertier fest, daß Brenztraubensäure genau wie Zucker Glykogen erzeugt und in Form von Milchsäure in den Urin übertreten kann. [P. Neukirch und P. Rona³⁾ fanden in Versuchen über die motorische Tätigkeit des Herzens und des Darms, daß von zahlreichen daraufhin geprüften Verbindungen außer den gärenden Monosacchariden allein die Brenztraubensäure die Bewegung der beiden Organe im Gang zu halten vermag und gleich den echten Zuckern als eine vielleicht unmittelbar ausnutzbare Quelle der Muskelkraft dienen kann³⁾. Für verschiedene Heferasen stellt nach F. Ehrlich⁴⁾ die Brenztraubensäure einen Kohlenstoff- und Energiespender dar, und H. v. Euler sowie E. Löwenhamm⁵⁾ haben angegeben, daß die Hefe ihr Enzym Invertase ebenso reichlich auf Kosten der Brenztraubensäure wie des Zuckers hervorzubringen imstande ist; nach G. Wagner⁶⁾ kann Brenztraubensäure die Glykose in den Nährböden für die Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe in chemischer wie diagnostischer Hinsicht glatt vertreten.

Die so gut begründete Annahme von der Rolle der Brenztraubensäure als einer Zwischenstufe des Zuckerabbaues ist nun jüngst erneut zur Erörterung gestellt worden. E. Zerner⁷⁾, der unsere früheren Angaben über die massenhafte Bildung von Acetaldehyd beim Abfangverfahren bestätigt hat, erblickt wie wir darin einen Beweis für das intermediäre Auftreten des Acetaldehyds, meint aber, Brenztraubensäure als dessen unmittelbare Muttersubstanz ablehnen zu können, weil sie angeblich unter den Bedingungen des Abfangverfahrens nicht mehr vergärbar sein soll, sobald die Menge des verwendeten schwefligsauren Salzes 1 Mol. Sulfit auf 1 Mol. Brenztraubensäure beträgt. Wir hatten früher, auf diesen Einwand nicht gefaßt, zwar die Vergärung

1) Johannes Kerb, B. 52, 1795 [1919].

2) Paul Mayer, Bio. Z. 40, 441 [1912]; 49, 486 [1913].

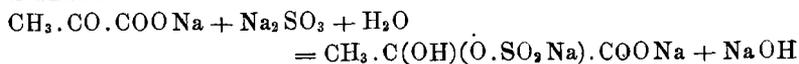
3) Pflüg. Arch. 146, 371; 148, 285 [1912].

4) Bio. Z. 36, 496 [1911]. 5) H. 97, 290 [1916].

6) Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., 71, 33 [1913].

7) B. 53, 325 [1920].

der Brenztraubensäure in Gegenwart eines beliebigen Überschusses an Calciumsulfid, aber nur in Anwesenheit von $\frac{1}{4}$ Mol. Dinatriumsulfid beschrieben ¹⁾ und haben kürzlich dargetan ²⁾, weshalb jene gegenteilige Behauptung unzutreffend ist, die sich auf unzulängliche Versuche stützt. Denn statt wie wir auf Entstehung von Acetaldehyd zu prüfen, hatte sich der Autor begnügt, allein auf freiwerdendes Kohlendioxyd zu fahnden, dabei außer acht lassend, daß in dem von ihm verwendeten System von brenztraubensaurem Alkali und Dinatriumsulfid.



die sich bildende Lauge ein sichtbares Entweichen etwa entwickelter Kohlensäure vereiteln muß. Weiter hatte er die Permeabilitätsverhältnisse der Hefezellen für schweflige Salze sowie die Herstellung einer richtigen Wasserstoff-Ionen-Konzentration in keiner Weise berücksichtigt.

Über allen Betrachtungen steht aber das Experiment. Wir zeigen nachstehend auf elf verschiedene Weisen, daß Brenztraubensäure nicht nur in Gegenwart des molekularen Quantums Dinatriumsulfid, sondern auch von mehr glatt vergoren wird.

Ja die Vergärung der äquivalenten Mengen Brenztraubensäure und schwefliger Säure geht bei Anwendung von Trockenhefen sogar in der Kälte und so stürmisch vor sich, daß sie sich als einer der schönsten zymochemischen Demonstrationsversuche in wenigen Minuten vorführen läßt (S. 1051).

I. Vergärung von Brenztraubensäure in Anwesenheit von 1 Mol. Dinatriumsulfid durch lebende Oberhefe.

Wir hatten mehrfach dargelegt, daß es schwer ist, die Verhältnisse nachzuahmen, die bei der Vergärung von Zucker in Gegenwart schweflige-saurer Salze bezüglich der H-Ionen-Konzentration in den Maischen herrschen. Denn der Zucker diosmiert, während die Zellen für das anorganische Zusatzmittel (Dinatriumsulfid) impermeabel sind. Wir haben aber schon früher auseinandergesetzt, daß das Problem in der Fragestellung beruht, ob die Brenztraubensäure-Sulfid-Verbindung noch durch das Hefenferment angreifbar ist und unter

¹⁾ C. Neuberg und E. Reinfurth, Bio. Z. 89, 413 [1918]; B. 52, 1689 [1919].

²⁾ B. 53, 462 [1920].

Loslösung von Kohlendioxyd zum Acetaldehyd-Sulfit-Komplex vergoren wird. Vor vielen Jahren hat Clewing¹⁾ gezeigt, daß Brenztraubensäure beim Zusammentreffen mit sekundären schwefligsauren Alkalien sich zu den außerordentlich beständigen Doppelverbindungen der Zusammensetzung $\text{CH}_3 \cdot \text{C}(\text{OH})(\text{O} \cdot \text{SO}_2 \text{Me}) \cdot \text{COOMe}$ vereinigt. Diese komplexen Salze zerfallen selbst bei 115—130° nicht in ihre Komponenten. Es findet also eine praktisch vollständige Vereinigung von Brenztraubensäure mit sekundären Sulfiten (wie auch mit Thio-sulfat²⁾) statt. Dabei kommt es darauf an, zu zeigen, daß diese so widerstandsfähige Brenztraubensäure-Schweflige-Säure der Spaltung durch die Carboxylase unterliegt. Das gelingt leicht, wenn man eine für die Entfaltung dieses Enzyms günstige H-Ionen-Konzentration herstellt³⁾.

Hierzu bedient man sich der verschiedenen »Puffersysteme«, wie sie von Soerensen, Henderson und Michaelis empfohlen worden sind. Wir verwendeten als Puffer Essigsäure-Acetat-Gemenge, eine Citronensäure-Natriumcitrat-Mischung sowie Glykokoll.

Verfährt man auf diese Art, so kann man die Entwicklung von Kohlensäure aus solchen Systemen unmittelbar wahrnehmen, da bei der hergestellten Acidität das Kohlendioxyd ganz oder größtenteils frei wird. Sicherer aber ist es, die Menge des Acetaldehyds zu bestimmen, der aus der Brenztraubensäure durch Vergärung hervorgeht.

Versuch 1. 10 ccm *m*-Brenztraubensäure, 10 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 10 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch [enthaltend im Liter 60 g Eisessig sowie 72 g $\text{CH}_3 \cdot \text{COO Na} + 3\text{H}_2\text{O}$ ⁴⁾] wurden mit 70 ccm Wasser nebst 15 g frischer obergäriger Hefe *M* (= 3 g Trockensubstanz) versetzt. Bei 37° begann alsbald die Kohlensäure-Entwicklung. Wir ließen diesen Versuch 5 Tage im Brutschrank stehen, d. h. ebenso lange, wie in der Regel die Ansätze von Zucker mit größeren Sulfitmengen zur Ausgärung benötigen.

Zur Bestimmung des Acetaldehyds bedienten wir uns des Destillations-Titrations-Verfahrens, das wir früher für die exakte Ermittlung des Aldehyds in Gäransätzen angegeben hatten. Dabei verfahren wir folgendermaßen: Das Gärgemisch wurde mit 5 ccm *m*-Sodalösung versetzt und mit überschüssigem Chlorbarium (20 ccm *m*-BaCl₂-Lösung) ausgefällt. Von dem klar filtrierten Gemische wurde ein aliquoter Teil mit überschüssigem kohlen-sauren Calcium im Dampfstrom destilliert, wobei die in Lösung vor-

¹⁾ C. Clewing, J. pr. [2] 17, 241 [1878].

²⁾ C. Böttinger, B. 15, 892 [1882].

³⁾ Die genauen Angaben über die optimale H-Ionen-Konzentration der Carboxylase-Wirkung sollen später mitgeteilt werden.

⁴⁾ Auch andere Zusammensetzungen des »Acetat-Puffers« sind anwendbar

handene Acetaldehyd-Sulfit-Verbindung verlustlos gespalten wird, event. unvergoren gebliebene Brenztraubensäure jedoch als nicht flüchtiges Salz sich im Rückstande befindet. Der unter den von uns früher beschriebenen Vorichtsmaßregeln aufgefangene Aldehyd würde dann nach der Methode von Ripper-v. Fürth ermittelt. Gefunden wurden für das gesamte Gärgut 0.2032 g Aldehyd; 10 ccm der angewandten *m*-Brenztraubensäure enthielten 0.88 g $\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH}$, die maximal 0.44 g Acetaldehyd liefern können. Die Ausbeute betrug mithin 46.2% der Theorie.

Versuch 2. Der Ertrag an Aldehyd, der in den folgenden Versuchen viel höher war, stieg auch mit dieser Hefe bei Ausdehnung der Gärdauer auf 7 Tage. Ein Ansatz, der, analog Versuch 1 bereitet, während dieser Zeit im Brutschranke digeriert wurde, ergab für das gesamte Gärgut 0.2812 g Acetaldehyd = 63.9% der möglichen Menge.

Versuch 3. Als recht geeignet erwies sich bei der frischen obergärigen Hefe der »Citrat-Puffer«. 20 ccm *m*-Brenztraubensäure, 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 10 ccm *m*-Citronensäure-Lösung nebst 10 ccm $\frac{2}{3}$ *m*-Natriumcitrat-Lösung wurden mit 140 ccm Wasser sowie 30 g obergäriger Hefe *M* versetzt und bei 34° 7 Tage lang sich überlassen. Die Aldehydausbeute belief sich auf 0.7199 g = 81.8% der Theorie.

II. Vergärung äquivalenter Mengen von Brenztraubensäure und schwefligsaurem Natrium mittels frischer untergäriger Hefe.

Bereits früher haben wir gezeigt¹⁾, daß auch die empfindlicheren Unterhefen die Spaltung des Zuckers in Acetaldehyd, Kohlensäure und Glycerin nach der zweiten Vergärungsform herbeizuführen geeignet sind, wenn man sie in eine zweckmäßige Umgebung bringt; daß die Brenztraubensäure durch Unterhefen ebenso gut umgesetzt wird, wie durch obergärrige Rassen, steht seit 10 Jahren fest²⁾. Bei Zufügung der erwähnten Puffer gelingt die Zerlegung der Brenztraubensäure in Gegenwart äquivalenter Mengen schwefliger Säure auf die einfachste Weise.

Versuch 4. 10 ccm *m*-Brenztraubensäure, 10 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 10 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch und 70 ccm Wasser wurden mit 15 g untergäriger Hefe Nr. 1103 des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin versetzt und im Brutschrank 4 Tage bei 37° belassen. Die Aufarbeitung ergab für die ganze Maische 0.4010 g Acetaldehyd; das sind 91.1% der theoretischen Menge.

Versuch 5. Bei dieser untergärigen Hefe war der Citrat-Puffer weniger wirksam. Ein Ansatz, bestehend aus 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 20 ccm *m*-Brenztraubensäure, 10 ccm *m*-Citronensäure, 10 ccm $\frac{2}{3}$ *m*-Natriumcitrat,

¹⁾ C. Neuberg und E. Reinfurth, B. 52, 1697 [1913].

²⁾ C. Neuberg und A. Hildesheimer, Bio. Z. 31, 170 [1910]; C. Neuberg und L. Tir, Bio. Z. 32, 323 [1911] u. f. Bände.

140 ccm Wasser und 30 g untergärrige Hefe Nr. 1103 lieferte nach einwöchentlicher Gärdauer 0.4826 g Acetaldehyd = 54.8% der Theorie.

Versuch 6. Zu einer Mischung von 20 ccm *m*-Brenztraubensäure, 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit und 160 ccm Wasser wurden 4 g Glykokoll als Puffer hinzugesetzt und das Ganze mit 30 g der untergärrigen Hefe bei 35° vergoren. Die Analyse führte zu 0.5358 g Acetaldehyd, was 60.9% der abspaltbaren Menge ausmacht.

III. Vergärung von molekularen Mengen Brenztraubensäure und schwefliger Säure durch obergärrige Trockenhefe.

Im besten Einklange mit unserer Anschauung, daß die Permeabilitätsverhältnisse der Hefenzellen von Bedeutung für diese Vorgänge sind, stehen die Versuche, in denen anstatt frischer Hefe Trockenhefen verwendet wurden. Nach den Vorstellungen, die Beijerinck und van Hest¹⁾ entwickelt haben, scheint beim Trocknen der Hefezellen und nachfolgender Maceration eine Öffnung der Plasmahaut stattzufinden, wobei Sprünge und Risse auftreten. Es ist klar, daß eine so vorbereitete, gewissermaßen siebförmig durchlöcherete Hefe die schnellere und innigere Berührung von Ferment und Substrat ermöglicht. Dementsprechend verläuft die Sulfit-Gärung der Brenztraubensäure ganz besonders glatt und rasch, oft geradezu stürmisch, bei Verwendung von Trockenhefen²⁾; auch unter diesen Bedingungen wird die als Zwischenprodukt angesehene Ketonsäure mit größerer [Geschwindigkeit als der Zucker selbst umgesetzt.

Versuch 7. 20 ccm *m*-Brenztraubensäure, 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 20 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch, 140 ccm Wasser, 1 ccm Toluol und 30 g obergärrige Trockenhefe *M* wurden kräftig durchgeschüttelt und dann 5 Tage aufbewahrt. Dabei wurde der Ansatz in den ersten zwei Tagen bei Zimmertemperatur (19°) und in den folgenden im Brutschrank bei 37° digeriert. Die Aufarbeitung vollzog sich genau wie bei den frischen Hefen. Acetaldehyd war in einer Menge von 0.8117 g = 92.2% der Theorie entstanden.

IV. Vergärung des Brenztraubensäure-Sulfit-Komplexes durch untergärrige Trockenhefen.

Die untergärrigen Trockenhefen, von denen wir eine größere Reihe untersucht haben, verbielten sich eher noch gärkräftiger als das Prä-

¹⁾ M. W. Beijerinck und J. J. van Hest, *Folia microbiolog.* 4, Heft 2, 1916.

²⁾ Man könnte auch in Betracht ziehen, daß unter diesen günstigen Verhältnissen die durch Beladung mit dem Schwefligsäurerest in gewisser Hinsicht aufgelockerte Brenztraubensäure besonders leicht zerfällt, wie das für die Sulfitverbindung anderer Carbonsäuren, z. B. der Dioxoweinsäure und der Phthalonsäure, bekannt ist.

parat an der obergärigen Rasse. Wir verwendeten für die quantitativen Versuche Trockenformen der Schultheiß-Brauerei, Berlin, ferner der Hefe Nr. 1103 des Instituts für Gärungsgewerbe sowie die käufliche Trockenhefe von Schroder-München, während qualitative Experimente (s. S. 1051) noch mit anderen Sorten angestellt wurden.

Versuch 8. 20 ccm *m*-Brenztraubensäure, 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 20 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch, 140 ccm Wasser und 1 ccm Toluol wurden mit 30 g untergäriger Trockenhefe Nr. 1103 versetzt und 5 Tage lang analog Versuch 7 vergoren. Gefunden wurden 0.6933 g Acetaldehyd, was 78.8% der Theorie bedeutet.

Versuch 9. Zu einer Mischung von 20 ccm *m*-Brenztraubensäure, 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 20 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch, 140 ccm Wasser und 1 ccm Toluol wurden 20 g untergärige Trockenhefe der Schultheiß-Brauerei-Berlin gefügt und die Maische für 5 Tage in den Brutschrank bei 37° gestellt. Es waren im ganzen 0.9070 g Aldehyd abgespalten worden. Da der theoretische Wert 0.88 g betragen müßte, ergab diese Analyse sogar einen Mehrgehalt von 2.7%, der wohl auf eine unbedeutende Selbstgärung zurückzuführen ist.

Man kann also eine quantitative Vergärung der Brenztraubensäure-Sulfit-Verbindung erreichen.

Wir haben schon früher¹⁾ darauf hingewiesen, daß im allgemeinen die Selbstgärung zu keiner nennenswerten Bildung von Acetaldehyd unter dem Einflusse zugesetzter schwefligsaurer Salze Anlaß gibt. Offenbar können die bei diesem in seinem Wesen noch nicht ganz aufgeklärten Vorgänge sich abspielenden Umsetzungen nicht einfach dem Prozesse der alkoholischen Gärung gleichgesetzt werden. Übrigens haben wir durch besondere Kontrollen hier wie in zahlreichen anderen Fällen festgestellt, daß die verwendeten Hefen und Hefezubereitungen für sich (d. h. ohne Brenztraubensäure) keine quantitativ bestimmbare Aldehydmenge lieferten. Wir fügen hinzu, daß bei der von uns geübten Bereitung der Trockenhefen im Luftstrom des Faust-Heimschen Apparates Dauerpräparate erhalten wurden, die häufig überhaupt keine Selbstgärung aufwiesen.

Versuch 10. Zur Kontrolle wurden 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 20 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch, 160 ccm Wasser, 1 ccm Toluol und 30 g untergärige Trockenhefe der Schultheiß-Brauerei ganz analog dem Versuch 9 bei 37° 5 Tage digeriert. Bei der Verarbeitung nach dem Destillations-Titrations-Verfahren ergab sich, daß Acetaldehyd lediglich in solchen Spuren vorhanden war, daß er eben sich qualitativ erkennen ließ, ohne die Möglichkeit seiner quantitativen Bestimmung zu bieten.

¹⁾ B. 52, 1688 [1919].

Zu demselben Resultat führte Versuch 11. 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit und nur die halbe Puffermenge, also 10 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch, 170 ccm Wasser, 1 ccm Toluol und 30 g Trockenmaterial aus Unterhefe 1103. Es waren nur minimalste Spuren Acetaldehyd gebildet.

Wie vorhin erwähnt, wird in Gegenwart von Puffergemischen auch das entstandene Kohlendioxyd frei. Wir nahmen solche Versuche in Eudiometern über Quecksilber vor, die aus graduierten Azotometern bestanden (wie sie zur Stickstoff-Bestimmung nach Dumas dienen), nachdem dieselben durch Abschmelzen des seitlichen Zuführungsrohres (für den gasförmigen Stickstoff) in ein System kommunizierender Röhren verwandelt worden waren. Man hat dabei den Vorteil, durch Herstellung eines Unterdruckes die Übersättigung mit Kohlensäure leicht aufheben und unter Berücksichtigung des Niveaus die entwickelte Kohlensäuremenge bei der sauren Reaktion mit genügender Genauigkeit unmittelbar ablesen zu können. Wir erhielten, ganz entsprechend den Ergebnissen der Aldehyd-Analysen, hierbei 80—100 % der theoretisch möglichen Menge CO₂.

Bei dem durchaus gleichsinnigen Ausfall der Versuche beschränken wir uns auf die Beschreibung von zwei Ansätzen.

Versuch 12. In das Eudiometer füllten wir 2 ccm *m*-Brenztraubensäure, 2 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 2 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch und 14 ccm von einer Aufschwemmung von 4.5 g untergäriger Trockenhefe der Schultzei-Brauerei in 21 ccm H₂O sowie 0.5 ccm Toluol. Die CO₂-Entwicklung setzte unmittelbar in der Kälte ein und war nach 1 Stde. bereits auf der Hälfte des theoretischen Wertes angelangt. Der Ansatz blieb zunächst 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen und kam dann noch 10 Stdn. in einen Brutschrank von 35°. Nach beendeter Gärung betrug das CO₂-Volumen 43.8 ccm (bei 15°); 2 ccm *m*-Brenztraubensäure = 0.176 g können 0.088 g CO₂ abspalten; diese würden bei Normalverhältnissen ein Volumen von 44.8 ccm einnehmen. Der erzielte Wert ist somit nahezu der maximale gewesen.

Versuch 13 wurde in derselben Weise ausgeführt wie Nr. 12, nur gelangte das Trockenpräparat aus der obergärigen Rasse M zur Verwendung. Die abgespaltene Kohlensäure belief sich auf 43.4 ccm.

V. Vergärung von Pyruvinat-Sulfit durch das Aceton-Dauerpräparat aus obergäriger Hefe.

Vielfach andere Eigenschaften als frische oder getrocknete Hefen besitzen die Hefen, die man durch Behandlung mit Aceton entwässert und damit haltbar gemacht hat¹⁾. Auch bei ihnen ist die Durchlässigkeit erheblich geändert. Das Aceton-Dauerpräparat bereiteten wir aus obergäriger Hefe M des Institutes für Gärungsgewerbe. Soweit wir sehen, sind bislang Aceton-Dauerpräparate nur

¹⁾ R. Albert, E. Buchner und R. Rapp, B. 35, 2376 [1902].

aus untergärigen Rassen hergestellt; doch erwies sich auch die erwähnte Oberhefe für unsere Zwecke als sehr geeignet.

Versuch 14. 20 ccm *m*-Brenztraubensäure, 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 20 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch, 140 ccm Wasser, 1 ccm Toluol und 30 g Aceton-Dauerhefe M wurden 48 Stdn. bei Zimmertemperatur und weiter ebenso lange bei 37° der Gärung überlassen. Die Analyse ergab 0.7758 g Acetaldehyd = 88.2 % der Theorie.

VI. Vergärung von äquivalenten Mengen Brenztraubensäure und Sulfit in Gegenwart von untergäriger Aceton-Hefe.

Das Material war aus Rasse Nr. 1103 des Institutes für Gärungsgewerbe gewonnen.

Versuch 15. Eine Maische, enthaltend 20 ccm *m*-Brenztraubensäure, 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 20 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch, 140 ccm Wasser, 1 ccm Toluol und 20 g mit Aceton zubereiteter Unterhefe Nr. 1103, lieferte nach einer Gärdauer von 4 Tagen insgesamt 0.7814 g Acetaldehyd, entsprechend 88.8 % des möglichen Wertes.

VII. Vergärung des Brenztraubensäure-Schwefligsäure-Komplexes durch Alkohol-Äther-Hefe.

Die Leichtigkeit, mit der sich die Vergärung der Brenztraubensäure in Gegenwart eines ganzen Moleküls Na_2SO_3 vollzieht, enthüllt sich besonders durch Heranziehung von Alkohol-Äther-Hefen. R. Albert¹⁾ hat angegeben, daß die Alkohol-Äther-Hefen sehr viel schwächer wirksam sind als Aceton-Präparate. Wir gingen überdies noch von einem weniger geeigneten obergärigen Material aus, und zwar von keiner garantierten Reinzucht, sondern von käuflicher Berliner Bäckerhefe, sogen. Verbandshefe. Aus Gründen der Ersparnis diente ferner zur Herstellung auch nicht der vorgeschriebene absolute Alkohol, sondern der mit Holzgeist und Pyridin vergällte Alkohol, sogen. Methylsprit. Trotz der Häufung aller dieser ungünstigen Umstände vergor das Alkohol-Äther-Präparat aus obergäriger Verbandshefe recht glatt den Pyruvinat-Komplex. Der Ertrag ist in diesem Falle sogar quantitativ gewesen.

Versuch 16. 20 ccm *m*-Brenztraubensäure wurden in Gegenwart von 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 20 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch, 1 ccm Toluol und 140 ccm Wasser durch 11 g der Alkohol-Äther-Trockenhefe in 4 Tagen vergoren. Die Ausbeute betrug 0.8798 g, was der theoretischen Forderung gleichkommt.

¹⁾ R. Albert, B. 33. 3775 [1900].

VIII. Vergärung äquivalenter Mengen von Brenztraubensäure und schwefligsaurem Natrium durch toluolisierte frische Hefe.

Vor Jahren haben Neuberg und Karczag¹⁾ sowie später Neuberg und Iwanoff²⁾ dargetan, daß Brenztraubensäure auch in Gegenwart solcher Substanzen vergoren wird, welche die lebenden Hefezellen vergiften, d. h. mit anderen Worten, daß das Teilferment Carboxylase widerstandsfähiger als der Gesamt-Enzymkomplex der Zymase ist. Demnach mußte es möglich sein, auch unter solchen Bedingungen die Pyruvinat-Sulfit-Doppelverbindung zu vergären. Das Ergebnis ersieht man aus:

Versuch 17. In Gegenwart von 10 ccm Toluol wurden 20 ccm *m*-Brenztraubensäure, 20 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 20 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch, verdünnt mit 140 ccm Wasser, durch 30 g frische untergärige Hefe der Schultheiß-Brauerei Berlin vergoren. Nachgewiesen wurden 0.7529 g = 85.6 % der Theorie an Acetaldehyd.

IX. Vergärung äquivalenter Mengen von Brenztraubensäure und Sulfit durch Hefe-Macerationssäfte.

Um Einflüsse, die von der lebenden Substanz ausgehen, auszuschließen, hatten bekanntlich Neuberg und Färber³⁾ das zum Beweise der Acetaldehyd-Brenztraubensäure-Theorie ausgearbeitete »Abfangverfahren« zuerst auf zellfreie Systeme angewendet und schon im Jahre 1916 mitgeteilt, daß auch Hefensäfte in Gegenwart schwefligsaurer Salze die Acetaldehyd-Glycerin-Spaltung des Zuckers herbeiführen. Demgemäß mußte es gelingen, die als Zwischenprodukt anzunehmende Brenztraubensäure gleichfalls ohne Mitwirkung lebender Hefezellen in Anwesenheit äquivalenter Mengen von schwefliger Säure zu vergären. Das ist in der Tat ohne weiteres ausführbar.

Versuch 18. 5 ccm *m*-Brenztraubensäure und 5 ccm *m*-Dinatriumsulfit wurden mit 80 ccm Macerationssaft der untergärigen Hefe Nr. 1103, der keine Selbstgärung aufwies, in Gegenwart von 1 ccm Toluol zur Gärung gebracht. Temperatur: 37°. Nach 5 Tagen gelangte der Versuch zur Aufarbeitung und lieferte 0.2153 g Acetaldehyd = 97.9 % der Theorie.

Ebenso verlief ein Versuch mit Saft aus Schrodgerscher Hefe. Wir haben ein gleiches Verhalten festgestellt für einen Macerationssaft aus der Hefe der Happoldt-Brauerei, Berlin. Der Saft einer untergärigen Hefe der Schultheiß-Brauerei vergor bemerkenswerterweise stürmisch schon bei Zimmertemperatur. Nach

¹⁾ C. Neuberg und L. Karczag, Bio. Z. 36, 76 [1911].

²⁾ C. Neuberg und N. Iwanoff, Bio. Z. 67, 1 [1914].

³⁾ C. Neuberg und E. Färber, Bio. Z. 78, 238 [1916].

einer halben Stunde war bereits die Hälfte der theoretisch möglichen Menge Kohlendioxyd entwickelt. Wir wollen bei dieser Gelegenheit eine eigenartige Beobachtung anführen: Es tritt nämlich zumeist eine beträchtliche Verlangsamung des Gärungsvorganges ein, wenn das abgespaltete Kohlendioxyd etwa zur Hälfte entwichen ist; die Vergärung geht dann in der Regel erst in 24 Stdn. bis 3 Tagen bei 37° zu Ende.

Weiter bemerken wir, daß bei den Hefesäften, die ja infolge der Maceration sehr reichlich die natürlichen Puffer des Zellinneren enthalten, die künstliche Zugabe eines Acetatgemisches nicht unbedingt erforderlich ist; freilich gelangt bei der Verwendung eines solchen der Prozeß schneller und vollständiger zum Abschluß. Dabei tritt zugleich die Rolle des Acetats sehr schön zutage. In den Proben ohne diesen Puffer kommt es nämlich trotz des »neutralen Charakters« der Verbindung $\text{CH}_3 \cdot \text{C}(\text{OH})(\text{O} \cdot \text{SO}_2 \text{Na}) \cdot \text{COONa}$ häufig zu allmählich immer stärker werdenden Ausflockungen in dem klaren Saft. Da diese nach Zugabe des Acetat-Gemisches gar nicht oder viel langsamer auftreten, darf man letzterem außer der regulierenden noch eine Eiweiß »lösende« Wirkung zuschreiben, die ja wohl auch bei den Hefen selbst eine Verstopfung der Poren mit Proteingerinnseln hintanhält.

X. Vergärung von Calciumpyruvinat-Sulfit.

Die Richtigkeit unserer Auffassung, daß bei zweckmäßiger H-Ionen-Konzentration die Vergärung der Brenztraubensäure in Gegenwart eines ganzen Moleküls Sulfit glatt vor sich geht, ergibt sich erneut daraus, daß man nicht den Zusatz eines Puffergemisches zu machen braucht, sondern daß es genügt, ein lösliches Salz des Pyruvinat-Sulfit-Komplexes zu verwenden, das eine möglichst neutrale Reaktion aufweist.

Diese Bedingung erfüllt das Calciumsalz $\text{CH}_3 \cdot \text{C}(\text{OH}) \left\langle \begin{array}{l} \text{O} \cdot \text{SO}_2 \\ \text{CO} \cdot \text{O} \end{array} \right\rangle \text{Ca}$.

Während das Calciumsalz der schwefligen Säure in Wasser bekanntlich sehr schwer löslich ist, ist das Calciumsalz der Brenztraubensäure-Sulfit-Verbindung löslich¹⁾ Dementsprechend erhält man bei Zugabe einer molekularen Chlorcalciumlösung zu einem Gemisch von *m*-Brenztraubensäure und der äquimolekularen Menge Dinatriumsulfit keinen Niederschlag von CaSO_3 , sondern es entsteht die lösliche und sehr beständige Calciumverbindung obiger Zusammensetzung.

Die Lösung dieses Salzes, in dem genau wie bei dem sonst verwendeten Dinatriumsalz die Vereinigung von 1 Mol. Sulfit mit 1 Mol.

¹⁾ Clewing, l. c.

Brenztraubensäure vorliegt, vergärt ohne jeden Pufferzusatz und zwar restlos.

Versuch 19. Ein Ansatz, bestehend aus 10 ccm *m*-Brenztraubensäure, 10 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 10 ccm *m* Chlorcalcium und 70 ccm Wasser, wurde mit 10 g untergäriger Hefe Nr. 1103 zwei Tage bei 37° im Brutschrank digeriert. Die Ausbeute an Acetaldehyd belief sich auf 0.2210 g = 100% der Theorie.

Daß nicht etwa ein Sonderfall vorliegt, geht daraus hervor, daß wir uns in qualitativen Versuchen davon überzeugt haben, daß diese Vergärung der Calcium-pyruvinat-Sulfit-Lösung — genau wie mit der untergärigen Hefe Nr. 1103 — auch gelingt mit frischer obergäriger Hefe, mit dem Aceton-Dauerpräparat aus obergäriger Rasse M, mit obergäriger Trockenhefe M, mit Trockenhefe von Schroder in München sowie mit solcher aus Hefe der Schultheiß-Brauerei in Berlin. Dabei verlief in der Kälte die Gärung vollständiger mit Trockenmaterial sowie Aceton-Dauerpräparat aus untergäriger Schultheiß-Hefe, in der Wärme besser mit trockener Unterhefe 1103 sowie mit Trocken- und Aceton-Dauerpräparaten der obergärigen Rasse M.

XI. Die Vergärung von Brenztraubensäure in Gegenwart von mehr als ein Mol. Dinatriumsulfit.

Wenn man die Umsetzung des Zuckers nach der 2. Vergärungsform mit Hilfe des »Abfangverfahrens« herbeiführt und dabei sekundäres schwefligsaures Natrium als Bindestoff für den Acetaldehyd benützt, so kann man, wie wir früher mehrfach gezeigt haben, zwar über 100% an Zusatzmittel hinausgehen; allein die Reaktion schreitet dann infolge Empfindlichkeit der Hefen gegen die höhere Konzentration an löslichen schwefligsauren Salzen nur langsam fort und kommt erst in Wochen nach erneuter Hefezugabe zum Abschluß. Eine glatte Vergärung in 5—6 Tagen gelingt zumeist nur, wenn die Menge des zugefügten Dinatriumsulfits nicht 75% vom Gewichte des angewandten Zuckers übersteigt. Dieses Verhältnis von Zucker zu schwefligsaurem Salz entspricht ziemlich genau der Proportion 1 : 1 Mol. Da nun, unserem Gärungsschema gemäß, bei der 2. Vergärungsform aus 1 Mol. Zucker über 1 Mol. Brenztraubensäure 1 Mol. Acetaldehyd hervorgeht, so steht es wiederum mit den theoretischen Folgerungen im besten Einklange, wenn sich in den 19 vorstehend beschriebenen Versuchen die Brenztraubensäure als glatt zerlegbar in Gegenwart von 1 Mol. löslichem Sulfit erwiesen hat. Daß aber — genau so wie bei extremen Sulfitdosen der Zucker — so auch die Brenztraubensäure bei Vorhandensein von mehr als 1 Mol. schwefligsaurem Salz umsetzbar ist, zeigen die Versuche, bei denen die Vergärung in Anwesenheit von 1½ Mol. Dinatriumsulfit durchgeführt worden ist.

Versuch 20. 25 ccm *m*-Brenztraubensäure, 37.5 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 25 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch, 12.5 ccm Wasser und 50 g frische untergärige Hefe der Schultheiß-Brauerei wirkten 6 Tage lang bei 37° auf einander ein. Die Analyse ergab 0.6049 g Acetaldehyd, entsprechend 55.0% der theoretisch. möglichen Ausbeute.

Versuch 21. Hier war die Menge des Pufferungsmittels eine andere, indem 25 ccm *m*-Brenztraubensäure, 37.5 ccm *m*-Dinatriumsulfit, 37.5 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch und 12.5 ccm Wasser durch 50 g frische untergärige Hefe der Schultheiß-Brauerei in Gärung versetzt wurden. Nach 6 Tagen fanden wir 0.6603 g Acetaldehyd = 60.0% der Theorie.

Demonstrationsversuch über die Vergärung molekularer Mengen von Benztraubensäure und Dinatriumsulfit.

Um mit einfachsten Hilfsmitteln ohne Anwendung eines Thermostaten und in jeder Zeit reproduzierbarer Weise, zugleich unabhängig von Schwankungen im Zustande der Hefen, die Vergärung des Brenztraubensäure-Sulfit-Komplexes als Vorlesungsversuch in wenigen Minuten vorführen zu können, bedient man sich am zweckmäßigsten unseren vorstehenden Ausführungen zufolge der Trockenhefen. Man verfährt dabei folgendermaßen:

Man versetzt 2 ccm *m*-Brenztraubensäure mit 2 ccm *m*-Dinatriumsulfit und 2 ccm Essigsäure-Acetat-Gemisch¹⁾, verdünnt mit 14 ccm Leitungswasser und schüttelt in dieser Lösung 3 g Trockenhefe auf. Füllt man dieses Gemisch in ein Gärröhrchen, so setzt nach einigen Minuten, häufig schon nach Augenblicken, bei Zimmertemperatur (18—20°) eine stürmische Kohlendioxyd-Entwicklung ein, so daß das Gärgefäß in der Regel innerhalb 10—20 Minuten ausgegoren ist. Wir haben im Laufe der Jahre wohl mehr als 100-mal diesen Demonstrationsversuch ausgeführt und dabei Trockenhefen beliebiger Herkunft (solche von Schroder in München, Trockenpräparate aus untergäriger Hefe Nr. 1103 sowie aus obergäriger Hefe, M des Instituts für Gärungsgewerbe, ferner solche der Happoldt-, Königstadt-, Patzenhofer-, Schultheiß-Brauerei usw.) bewährt gefunden. Das Ergebnis ist stets gleich, sofern die Hefe überhaupt gärkräftig ist; im allgemeinen setzt die Vergärung um so schneller ein, je frischer die Trockenhefe ist.

Schlußfolgerung.

In voller Übereinstimmung mit unseren älteren Angaben zeigen wir also auf elf verschiedene Weisen in vielfältig varierten Anordnungen, daß der Brenztraubensäure-Sulfit-Komplex mindestens ebenso

¹⁾ Es ist molekular in bezug auf Essigsäure und doppeltmolekular in bezug auf Natriumacetat, entsprechend der Zusammensetzung:



leicht wie freie Brenztraubensäure von Hefe vergoren wird. Die Ausdehnung der Versuche nach mannigfachen Richtungen entkleidet den Vorgang jeglicher Zufälligkeit. Alle Hefen und Hefezubereitungen bewirken die Zerlegung der Brenztraubensäure in Gegenwart einer äquivalenten oder überschüssigen Menge löslicher schwefligsaurer Salze. Unter günstigen Permeabilitätsverhältnissen, die den osmotischen Bedingungen der Zuckervergärung vergleichbar erscheinen, wird wiederum die Brenztraubensäure-Sulfit-Doppelverbindung trotz ihrer Beständigkeit schneller als die lockere Vereinigung von Zucker mit schwefligsaurem Salz vergoren, in vortrefflichem Einklange mit den Anforderungen, die an ein Durchgangsprodukt zu stellen sind.

Diese Ergebnisse stützen die von uns früher entwickelten Anschauungen auf neue Arten und bilden weitere Grundlagen für die »Acetaldehyd-Brenztraubensäure-Theorie der Gärung«, gegen die bisher kein stichhaltiger Einwand vorhanden ist.

123. A. Thiel:

Über die vermeintliche Allotropie des Bleis nach Heller.

[Aus dem Physikalisch-chemischen Institut der Universität Marburg.]

(Eingegangen am 19. April 1920.)

1. Die Umwandlung des Bleis und ihre bisherige Deutung.

Vor einigen Jahren hat H. Heller¹⁾ beobachtet, daß kompaktes Blei, unter angesäuerten Bleisalzlösungen aufbewahrt, nach kürzerer oder längerer Zeit eine auffällige Veränderung erfährt, indem es zunächst rissig und brüchig wird und schließlich zu Pulver zerfällt. Hinter dieser bei Zimmertemperatur stattfindenden Umwandlung vermutete er die Bildung einer allotropen Modifikation des gewöhnlichen Bleis, analog der Entstehung grauen Zinns aus weißem, und übergab das Beobachtungsmaterial E. Cohen, dem rühmlichst bekannten Forscher unserer metastabilen Metallwelt. Dieser hat in Gemeinschaft mit W. D. Helderman über die Untersuchung des vorliegenden Falles berichtet²⁾. Hiernach ist die Sachlage die folgende:

Die Hellersche Umwandlung erfolgt tatsächlich in der von ihrem Entdecker bereits beschriebenen Weise, besonders rasch unter Lösungen von Bleinitrat, aber auch unter sonstigen Bleisalzlösungen. Zum Blankhalten der Oberfläche wird zweckmäßig freie Säure zugesetzt. Eine chemische Reaktion zwischen Blei und Lösung findet

¹⁾ Ph. Ch. 89, 761 [1915].

²⁾ Ph. Ch. 89, 733 [1915].