



# **Die Bedeutung des Acetaldehyds bei der alkoholischen Gärung**

<https://hdl.handle.net/1874/301000>

4.9. 192. 1931.

**DIE BEDEUTUNG DES  
ACETALDEHYDS BEI DER  
ALKOHOLISCHEN GÄRUNG**

**H. VINKENBORG**

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT

s.  
cht







DIE BEDEUTUNG DES ACETALDEHYDS BEI DER  
ALKOHOLISCHEN GÄRUNG.



# DIE BEDEUTUNG DES ACETALDEHYDS BEI DER ALKOHOLISCHEN GÄRUNG.

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN  
GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUUR-  
KUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT  
TE UTRECHT,

OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS  
JHR. DR. B. C. DE SAVORNIN LOHMAN  
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER  
RECHTSGELEERDHEID, VOLGENS BESLUIT  
VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN  
DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER  
WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN

OP DONDERDAG 25 JUNI 1931  
DES NAMIDDAGS TE 3 UUR

DOOR

HELENA VINKENBORG

GEBOREN TE WAGENINGEN



W. J. THIEME & CIE — ZUTPHEN

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.



*Aan mijn Ouders  
en Verloofde.*



Het is mij een groote voldoening op deze plaats allen, die op eenigerlei wijze hebben medegewerkt aan het tot stand komen van dit proefschrift, dank te zeggen.

Deze dank geldt in het bijzonder:

U, Hoogleeraren der Wis- en Natuurkundige Faculteit, wier colleges en practica mij van zooveel nut geweest zijn.

U, Hooggeleerde SCHOORL ben ik zeer erkentelijk voor mijn chemisch-pharmaceutische vorming; ik beschouw het als een eer tot Uw leerlingen te behooren.

Hooggeleerde DE GRAAFF, Hooggeachte Promotor. Het getuigt van Uw ruime opvatting, dat Gij, onder de bijzondere omstandigheden waaronder dit proefschrift bewerkt is, de bereidwilligheid hebt gehad als mijn Promotor te willen optreden. Door Uw boeiend onderwijs hebt Gij mijn belangstelling voor Microbiologie weten aan te wakkeren, hetgeen mijn verdere studierichting bepaalde.

Bovendien heb ik U mijn botanisch-pharmaceutische opleiding te danken.

Hooggeleerde SÖHNGEN, het is mij een vreugde hier de gelegenheid te kunnen aangrijpen U dank te zeggen voor al hetgeen ik U verschuldigd ben. Uw steun en nooit verflauwende belangstelling voor mijn werk zijn mede oorzaak geweest, dat ik dit onderzoek heb kunnen afsluiten.

Als een groot voorrecht beschouw ik het, ofschoon niet tot Uw leerlingen behoorend, dit proefschrift onder Uw leiding te hebben mogen bewerken, en door persoonlijken omgang Uw meening omtrent de vele vraagstukken der Microbiologie te hebben leeren kennen.

De buitengewone gastvrijheid, waarmede Gij mij in Uw Laboratorium een zoo bevoorrechte plaats hebt gegeven, en

den vriendschappelijken omgang met U zal ik steeds met groote erkentelijkheid erkennen.

U, Zeergeleerde WIERENGA ben ik dankbaar voor Uw hulp en prettige samenwerking. Daar ik steeds alle problemen ook met U kon bespreken, hebt Gij, door menige raadgeving, medegewerkt aan het tot stand komen van dit proefschrift.

Tenslotte een woord van dank aan de beide amanuenses van het Laboratorium voor Microbiologie der Landbouwhoogeschool.

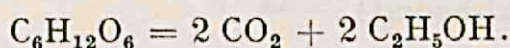
## EINLEITUNG.

---

Trotzdem die praktische Bedeutung der alkoholischen Gärung im Altertum schon allgemein bekannt war, wusste man, bis LAVOISIERS Untersuchungen am Ende des 18ten Jahrhunderts, von dem Chemismus nichts weiter, als dass bei dieser Vergärung Kohlensäure und Alkohol entstehen.

LAVOISIER war der erste, der es versuchte diesen Vorgang quantitativ zu verfolgen.

GAY-LUSSAC und DUMAS gebühren die Ehre eine Formel aufgestellt zu haben welche bis auf heute in Kraft geblieben ist:



Ein Teil des Zuckers wird jedoch durch die Hefe assimiliert und ein äusserst geringer Teil verwandelt in Nebenprodukte.

Nachdem versuchte man eine genauere Einsicht in die alkoholische Zuckergärung zu bekommen. Die hervorragendsten Untersucher nehmen an, dass der Weg vom Zucker zum Alkohol durch eine Reihe von Zwischenstufen führt, und diese Stufenreaktionen unter Einfluss verschiedener Enzyme vorsichgehen. Die von diesen Untersuchern abgefassten Schemata haben einen bedeutenden Berührungspunkt: und zwar dass dem Acetaldehyd die zentrale Stellung im Abbauprozesse des Zuckermoleküls zuerkannt wird. Dieser Acetaldehyd sollte aus der Brenztraubensäure entstehen.

Zweck meiner Untersuchung war die alkoholische Vergärung der Äpfelsäure durch *Schizosaccharomyces Pombe* zu erforschen. KLUYVER meint dass Äpfelsäure, sei es auch bei Anwesenheit von Zucker, durch diese Hefe direkt verwandelt in Kohlensäure und Alkohol. Weil obenerwähntes Prinzip, dass man den Prozess der alkoholischen Zuckergärung aufzufassen hat als eine Reihenfolge von Reaktionen, angewandt wird auf fast alle Prozesse der lebenden Natur, und der Acetaldehyd als intermediäres Stoffwechselprodukt bei zahlreichen Mikroorganismen, sowie bei höher entwickelten Pflanzen und Tieren

nachgewiesen sein sollte, wäre die Zerlegung der Äpfelsäure durch *Schizosaccharomyces Pombe* (wobei ohnehin dieselben Endprodukte entstehen als bei der alkoholischen Zuckergärung) als eine Ausnahme von der „allgemeinen Regel“ zu betrachten.

Diese blosse Tatsache schien schon einer näheren Untersuchung wert.

Es ist kein Bedenken gegen das theoretische Auftreten des Acetaldehyds als Zwischenprodukt bei dieser Spaltung, trotzdem Milchsäure und  $\beta$  Oxy-propionsäure durch *Schizosaccharomyces Pombe* nicht in Gärung gesetzt werden. Man kann sich ja denken, dass aus 1 Mol Äpfelsäure erst 1 Mol Kohlensäure entsteht, und die hierbei gebildete Verbindung, der Formel  $C_3H_6O_3$  entsprechend, denselben Weg verfolgt als bei der alkoholischen Zuckergärung:

$C_4H_6O_5 = CO_2 + C_3H_6O_3$  (eins der vielen möglichen Isomere von Methylglyoxal-hydrat).

Im Zusammenhang mit dieser Untersuchung musste auch die alkoholische Zuckergärung selbst näher erforscht werden, namentlich die zweite und dritte Vergärungsform. Nach NEUBERG tritt diese zweite Vergärungsform auf bei Hinzufügung von Sulfit oder Dimedon, die dritte unter Einfluss von Alkali.

In dieser Dissertation werden die ersten Veränderungen welche das Hexosemolekül erleidet, nämlich die Phosphorylierung, unberücksichtigt gelassen.

---

I. TEIL.

BEITRAG ZUR KENNTNIS DER ALKOHOLISCHEN  
VERGÄRUNG DER ÄPFELSÄURE DURCH  
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE.



## I. KAPITEL.

### DIE ALKOHOOLISCHE VERGÄRUNG DER ÄPFELSÄURE DURCH SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE.

---

#### § 1. ÄLTERE UNTERSUCHUNG.

KLUYVER <sup>1)</sup> u.a. haben bemerkt, dass Schiz. Pombe eine grosse Menge Kohlensäure aus Äpfelsäure entwickeln kann. Die Resultate von KLUYVERS Untersuchung (angestellt mit dem Vergärungsapparat von VAN ITERSON—KLUYVER) sind:

1. Die Zerlegung verläuft hauptsächlich nach der Gleichung:  
 $\text{COOH} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH} = 2 \text{CO}_2 + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}.$
2. Die Vergärung findet nicht oder wenigstens nicht wahrnehmbar statt, wenn nicht zugleich Zeit Zucker anwesend ist.
3. Acetaldehyd ist kein Zwischenprodukt bei dieser Vergärung.

Anlässlich der letzten Folgerung zitiere ich KLUYVER Seite 146:

„In tegenstelling met hetgeen bij de waarnemingen van NEUBERG geconstateerd werd, waar althans als primair product der vergisting aldehyd ontstaat (dat dan misschien voor een gedeelte secundair in alcohol wordt omgezet), zou hier bij de vergisting van appelzuur door S. POMBE het eerste geval gevonden zijn, waarin een niet-suiker direct in koolzuur en alcohol wordt omgezet, al zouden deze producten dan ook niet in dezelfde verhouding als bij de alcoholische gisting der suikers gevormd worden.”

Und Seite 150:

„Van NEUBERG's omzettingen, waarbij primair steeds aldehyden ontstaan, die dan wellicht gedeeltelijk in de overeenkomstige alcoholen worden overgevoerd, wijkt het hierboven

---

<sup>1)</sup> A. J. KLUYVER, Biochemische suikerbepalingen. Diss. Delft, 1914, 142—150.

beschreven proces dus, behalve in de reeds vroeger vermelde vershilpunten, ook in dit opzicht principieel af.''

Anlässlich dieses KLUYVERSchen Urteils sei hier bemerkt, dass dieses nicht fusst auf Untersuchungen, wenigstens werden diese in seiner Dissertation nicht erörtert; es sei hier nur darauf hingewiesen, dass KLUYVERS dritte Folgerung, welche doch sehr bedeutend ist, sich wahrscheinlich bloss auf Vermutung gründet.

## § 2. EIGNE UNTERSUCHUNG.

Bei einigen vorläufigen Versuchen stellte sich heraus, dass man um diese Vergärung zu untersuchen viel Hefe braucht. Wegen Hochkommens unerwünschter Microben darf die Gärung nicht zu lange währen; auf steriles Arbeiten wurde verzichtet. Auch Wachstum soll ausgeschlossen werden, da die Absicht vorlag nur die Gärung zu studieren<sup>1)</sup>. Deshalb wurden keine Nahrungssalze hinzugefügt, und als Gärungstemperatur 38—40° C gewählt. Durch Zählung der Hefezellen vor, während und nach dem Versuch war festgestellt, dass kein Absterben stattgefunden hatte bei einer Anfangskonzentration der Äpfelsäure von 2—3 %.

Es hält schwer über grosse Quantitäten Schiz. Pombe zu verfügen, während es so leicht ist zu *Saccharomyces cerevisiae* zu gelangen, den man von einer Presshefefabrik oder Brauerei bezieht.

### Die Züchtung der Hefe Pombe.

Schiz. Pombe wächst verhältnismässig langsam, deshalb habe ich folgendermassen verfahren:

Erst wurde kultiviert auf Würzeagar (5° Balling), schwach angesäuert mit Milchsäure. Nach 24stündigem Stehen bei ungefähr 30° C wurden 4 Erlenmeyerkolben, jeder mit 200 ccm schwach angesäuerter steriler Malzwürze (10° Bllg), mit der auf dem Würzeagar gewachsene Hefemasse beimpft, und diese Kolben blieben ungefähr einen Tag lang in Schüttelbewegung bei zirka 30° C. Ihr Inhalt wurde schliesslich ausgegossen in

1) A. J. KLUYVER, Biochemische suikerbepalingen. Diss. Delft, 1914, 44.

einen birnenförmigen Kolben, der 3.2 L. sterile Malzwürze enthielt, und dieser Kolben wurde 2 Tage lang geschüttelt bei  $30^{\circ}\text{C}$ , so dass die Flüssigkeit soviel wie möglich der Luft ausgesetzt war. Die Hefe wurde gleich oder nach einer Nacht Stehens abzentrifugiert und dreimal gewaschen mit Wasser.

### Ausführung des Versuchs und Nachweis der Endprodukte.

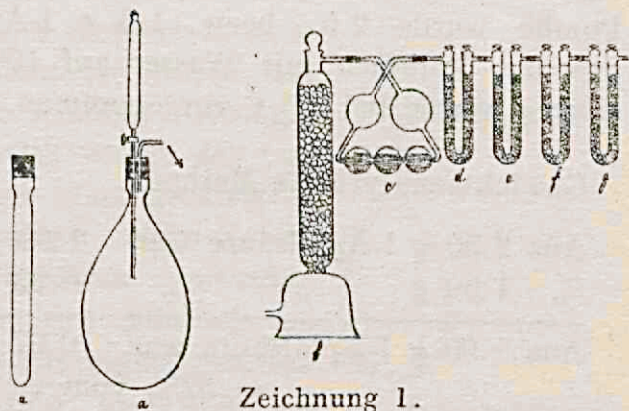
Einer Suspension von Schiz.Pombe in Wasser wurde 2 bis 3 % Äpfelsäure zugefügt. Diese Vergärung geschah in einem flachen Kolben (siehe Zeichnung 1), der in einem Wasserbad von  $38\text{--}40^{\circ}\text{C}$  in regelmässig schüttelnder Bewegung gehalten wurde. Das Gas ist in Büretten über gesättigter Kochsalzlösung aufgefangen worden.

Bald stellte sich heraus, dass die optisch inaktive Äpfelsäure nicht vergoren wurde nach der KLUYVERSchen Gleichung. Aus der natürlichen linksdrehenden Säure entstand viel mehr Kohlensäure als aus der inaktiven. Aus Links-Äpfelsäure wurden Kohlensäure und Alkohol gebildet.

### Quantitative Analyse der ausgegorenen Flüssigkeit.

#### A. Bestimmung der entwickelten Kohlensäure.

Neben der obenbeschriebenen volumetrischen Methode ist zur Kontrolle auf gravimetrischem Wege die Kohlensäure bestimmt, und zwar indem das entweichende getrocknete Gas absorbiert wurde in einem Kaliapparat, der vor und nach dem Versuch gefüllt mit Wasserstoff gewogen war.



Die ganze Anordnung ergibt sich aus Zeichnung 1.

Der Schüttelkolben a trägt einen Tropftrichter; der Trockenturm b und die U-Röhre e sind angefüllt mit Chlorcalcium-

stückchen<sup>1)</sup>. Der Kaliapparat c ist gefüllt mit konzentrierter Kalilauge, und die U-Röhre e ist mit Natronkalkstückchen beschickt; f ist eine Natronkalkröhre, deren rechte Schenkel mit Chlorcalcium gefüllt ist. Um von aussen zutretende Kohlensäure und Wasserdämpfe abzuhalten dient die Röhre g, deren innerer, dem Apparat zugewendeter Schenkel Chlorcalcium-Stücke, der äussere Natronkalk enthält.

Nach Ablauf der Vergärung, nach ca. 8 Stunden, musste die zurückgehaltene Kohlensäure ausgetrieben werden, wozu durch den Tropftrichter Wasserstoffperoxyd zugefügt wurde. Schliesslich ist der Sauerstoff durch Wasserstoff verdrängt worden.

Bei Verwendung einer grossen Quantität Hefe entstehen immer bedeutende Mengen Kohlensäure und Alkohol durch Selbstgärung. Zwar enthält Schiz. Pombe kein Glycogen, aber doch ein andres Reservekohlehydrat, welches eine bedeutende Selbstgärung veranlasst.

Deshalb ist erst 2.5 g l-Äpfelsäure zur Vergärung gebracht worden, und danach unter genau denselben Verhältnissen 1.5 g. Dann sind die Kohlensäuremengen von einander abgezogen worden, um das Quantum Kohlensäure zu finden, welches aus 1 g l-Säure entsteht.

Bei der Ermittlung der Menge des gebildeten Alkohols wendet man denselben Kunstgriff an.

Als Beispiel möge hier eine Analyse folgen:

Zwei Mengen von je 35 g zentrifugierter gewaschener Hefe Pombe wurde 2.5, bzw. 1.5 g l-Äpfelsäure hinzugefügt, und das Volumen mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Die Gärung wurde bei 39° C vorgenommen.

#### Gewichtsanalytische Methode:

Aus 2.50 g l-Äpfelsäure war	1.60 g CO <sub>2</sub> gebildet,
„ 1.50 g „ „	0.93 g „ „

---

Aus 1.00 g l-Äpfelsäure war 0.67 g CO<sub>2</sub> gebildet =  
= 67% vom Gewichte der Äpfelsäure.

1) Da das käufliche Chlorcalcium stets Kalk enthält der Kohlendioxyd zurückhalten würde, so musste das Chlorcalcium vor dem Gebrauch mit Kohlendioxyd gesättigt werden. Hierauf verdrängt man das Kohlendioxyd durch Kohlensäurefreie Luft.

## Volumetrische Methode:

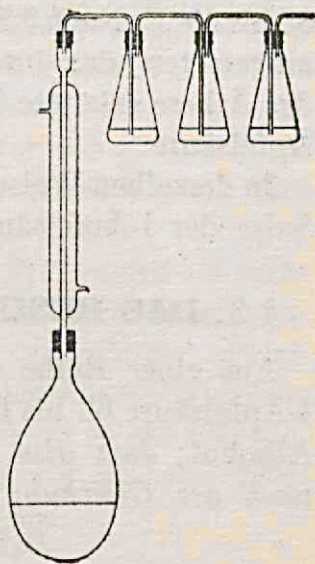
	Abgelesenes Volumen $\text{CO}_2$ in ccm.	
	2.5 g 1-Säure	1.5 g 1-Säure
Nach $\frac{1}{2}$ Stunde	193	169
" " "	365	297
" " "	517	403
" " "	644	482
	.	.
	.	.
	.	.
Sa.	948	625

Aus 2.5 g 1-Äpfelsäure entwickelte sich 948 ccm  $\text{CO}_2$ ,  
 „ 1.5 g „ „ „ 625 ccm „

Aus 1 g 1-Äpfelsäure entwickelte sich 323 ccm  $\text{CO}_2$  =  
 = 646 mg = 65 % vom Gewichte der Äpfelsäure.

## B. Bestimmung des gebildeten Alkohols.

In einem Gärungskolben wurde 60 g gewaschene zentrifugierte Hefe hineingebracht, und mit Wasser auf 100 ccm verdünnt. Dieser Kolben trug einen Kühler; das obere Ende des Kühlrohrs war verbunden mit 3 Erlenmeyerkölbchen, jedes mit 25 ccm Wasser. Nach dem Verlassen des Kolbens streicht die abgekühlte Kohlensäure durch das Wasser, wo etwaiger Alkohol zurückgehalten wird. Schliesslich wurde das Gas in einer Bürette über einer gesättigten Kochsalzlösung gesammelt (siehe Zeichnung 2). Dieses Verfahren bezweckte also ein Entweichen des Alkohols zu verhindern. Die Äpfelsäurekonzentration wurde auf 3 % gehalten, und wenn 1 g Säure vergoren war, musste dieses Gramm angefüllt werden, was geschah indem man die Säure in offnem Röhrchen durch den Kühler hinuntergleiten liess. Und so konnte in 10 Stunden 13 bis 14 g Säure vergoren werden.



Zeichnung 2.

Nach Ablauf der Vergärung ist der Inhalt der Erlenmeyerkölbchen durch den Kühler hineingespült, der Inhalt des Kolbens zentrifugiert, und die Hefe dreimal mit ungefähr 50 ccm Wasser gewaschen.

Die abzentrifugierte Flüssigkeit und das Waschwasser sind nach Ansäuerung destilliert; dieses Destillat ist durch wiederholtes Destillieren konzentriert, und das spezifische Gewicht mit Hilfe eines Pyknometers zur Feststellung des Alkoholgehalts bestimmt worden.

Hier folgt ein Beispiel:

Aus 12.97 g l-Äpfelsäure	war 5.51 g Alkohol	gebildet,
„ 9.93 g	„ 4.51 g	„ „

---

Aus 3.04 g l-Äpfelsäure war 1.00 g Alkohol gebildet =  
= 33 % vom Gewicht der Äpfelsäure.

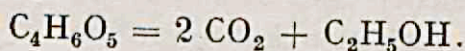
Rechts-Äpfelsäure wird nicht vergoren:

Eine Suspension von Schiz.Pombe zusammengebracht mit 2 % d-Äpfelsäure ergab keine Kohlensäureentwicklung bei 38 bis 40° C. Nach 8 Stunden war keine Verwandlung dieser Säure eingetreten; das durch Perforation mit Äther und Wegdampfen des Äthers erlangte Residuum bestand aus der ursprünglichen Äpfelsäure.

In derselben Weise ist die Vergärung der neutralen und sauren Salze der l-Äpfelsäure untersucht worden.

### § 3. DAS RESULTAT.

Aus einer Reihe von Bestimmungen ging hervor, dass aus l-Äpfelsäure 63 bis 67 % CO<sub>2</sub> gebildet wurde, und 30 bis 33 % Alkohol; dass also die Vergärung der l-Äpfelsäure stattfindet nach der Gleichung:



Diese Vergärung verläuft glatt ohne die Anwesenheit von Zucker.

Neutrale Malaten der l-Säure werden nicht vergoren. Saure Malaten der l-Säure zum Teil.

## II. KAPITEL.

### VERSUCHE MIT PRESS-SAFT.

---

Eine der Fragen, welcher wir bestimmt näher treten sollen, ist diese: Kommt das Enzym das die Äpfelsäurevergärung bewirkt auch in dem Press-saft des Schizosaccharomyces Pombe vor?

Um diese Frage beantworten zu können, bereitete ich den Press-saft der Hefe Pombe nach dem klassischen Verfahren BUCHNERS <sup>1)</sup>. Die Hefe wird in ein Presstuch eingeschlagen, und in einer hydraulischen Presse bei 50 Atmosphären während 5 Minuten ausgepresst; darauf wird sie gemengt mit der gleichen Gewichtsmenge Quarzsand und  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$  des Gewichts an Kieselgur, und durch ein Sieb geschlagen. Dieses Gemisch wird in einem Mörser portionenweise bis zum Zusammenballen zerrieben. Diese Masse liefert, nach Einschlagen in ein mit kaltem Wasser gut durchtränktes und bei 50 Atmosphären ausgepresstes Presstuch, in der hydraulischen Presse bei einem bis zu 300 Atmosphären steigenden Druck den Press-saft.

Zuerst lag 275 g Schiz.Pombe vor, später 465 g, und bevor die Masse gepresst wurde kontrollierte ich mikroskopisch dass die Hefezellen zerrissen waren.

Nach dem Abfiltrieren stellten sich die Press-säfte als nicht gärkräftig heraus; zusammengebracht mit Traubenzucker, bezw. gepufferter Brenztraubensäure <sup>2)</sup>, gepufferter Äpfelsäure trat anfänglich eine geringe Kohlensäureentwicklung ein, die aber nicht in Gang blieb; niemals kam es zur Gärung.

*Aus Schiz.Pombe kann man also ebensowenig als aus Oberhefen einen gärwirksamen Press-saft gewinnen.*

---

1) E. BUCHNER, H. BUCHNER und M. HAHN, Die Zymasegärung. München 1903.

2) Siehe diese Diss. 20.

---

### III. KAPITEL.

## DIE VERGÄRUNG DER ÄPFELSÄURE VERGLICHEN MIT DER DER BRENZTRAUBENSÄURE.

Fügt man einer Äpfelsäurevergärung Kalilauge oder wässrige Ammoniaklösung hinzu, so verläuft die Gärung schneller trotzdem diese Flüssigkeit nun weniger freie Äpfelsäure enthält:

### I. Versuch.

Einer Suspension von 5 g zentrifugierter gewaschener Hefe Pombe in Wasser wurde 2 g l-Äpfelsäure hinzugefügt, und 0, bzw. 5, 10, 15 ccm n-Kalilauge. Das Gesamtvolumen betrug 100 ccm. Die Kohlensäure wurde in Büretten über gesättigter Kochsalzlösung gesammelt. Die Vergärung geschah bei 36° C.

Das Ergebnis ist in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

I. TABELLE A.

Abgelesenes Volumen CO <sub>2</sub> in ccm.				
	0 ccm n-KOH	5 ccm n-KOH	10 ccm n-KOH	15 ccm n-KOH
Nach 5 Min.	42 <sup>1)</sup>	54	48	52
" " "	45	66	58	61
" " "	49	76	67	68
" " "	52	86	75	75
" " "	55	95	82	81
" " "	58	104	91	88
	. <sup>2)</sup>	.	.	.
	.	.	.	.
	.	.	.	.

1) Die Kolben sind gefüllt, gleich darauf in ein Wasserbad von 36° C eingesenkt, und in schüttelnder Bewegung gebracht. Anfangs entweicht also Gas (Luft) durch Ausdehnung. Diese Menge ist meistens nicht bestimmt, und in diesen Ablesungen mit einbegriffen.

2) Versuch abgebrochen.

Aus dieser Tabelle geht hervor:

I. TABELLE B.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

0 ccm n-KOH 5 ccm n-KOH 10 ccm n-KOH 15 ccm n-KOH

Nach 5 Min.	—	—	—	—
" " "	3	12	10	9
" " "	4	10	9	7
" " "	3	10	8	7
" " "	3	9	7	6
" " "	3	9	9	7
	.	.	.	.
	.	.	.	.
	.	.	.	.

II. Versuch.

Dieser Versuch wurde angestellt wie Versuch I, aber statt KOH 0, bzw. 2, 3, 4 ccm 10 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  hinzugefügt.

In den Ansätzen entwickelten sich folgende Mengen Kohlensäure:

II. TABELLE A.

Abgelesenes Volumen  $\text{CO}_2$  in ccm.

	0 ccm 10 % $\text{NH}_4\text{OH}$	2 ccm 10 % $\text{NH}_4\text{OH}$	3 ccm 10 % $\text{NH}_4\text{OH}$	5 ccm 10 % $\text{NH}_4\text{OH}$
Nach 5 Min.	50	50	48	40
" " "	54	66	63	50
" " "	58	83	77	58
" " "	62	98	91	66
" " "	66	113	103	73
" " "	69	128	115	80
	.	.	.	.
	.	.	.	.
	.	.	.	.

Am Ende der Vergärung nach dem Ansäuern:

— — 148 234

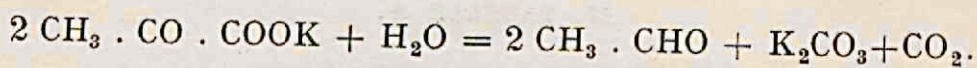
Hieraus geht hervor:

## II. TABELLE B.

	Gärgeschwindigkeit in ccm CO <sub>2</sub> .			
	0 ccm 10 % NH <sub>4</sub> OH	2 ccm 10 % NH <sub>4</sub> OH	3 ccm 10 % NH <sub>4</sub> OH	4 ccm 10 % NH <sub>4</sub> OH.
Nach 5 Min.	—	—	—	—
" " "	4	16	15	10
" " "	4	17	14	8
" " "	4	15	14	8
" " "	4	15	12	7
" " "	3	15	12	7
	.	.	.	.
	.	.	.	.
	.	.	.	.

NEUBERG und seine Mitwirker <sup>1)</sup> haben herausgefunden, dass Brenztraubensäure und höhere Ketosäuren durch lebende Hefe und Hefepräparate schnell in Kohlensäure und Aldehyd zerlegt werden. Diese Umwandlung ist also rein enzymatischer Natur, und das Enzym erhielt den Namen: Carboxylase.

Die Vergärung von Kaliumpyruvinat verläuft nach NEUBERG <sup>2)</sup> in derselben Weise:



Welche Auffassung wir uns von der Vergärung der Pyruvinate zu machen haben ist mir nicht klar, denn im Jahre 1927 äussert NEUBERG sich folgendermassen <sup>3)</sup>: „es ist zweifelhaft, ob die brenztraubensauren Salze überhaupt die Zellhaut durchdringen, d. h. ob aus einer überschüssige Hydroxylionen enthaltenden Flüssigkeit Alkalipyruvinat in die Hefe gelangt“.

1) C. NEUBERG mit A. HILDESHEIMER, L. KARZAG, J. KERB und P. ROSENTHAL, Über Zuckerfreie Hefegärungen. I—XI. Biochem. Z. **31**, 170; **32**, 323; **36**, 60, 68, 76; **37**, 170; **38**, 516; **43**, 44, 491; **47**, 405; **51**, 128 (1910—'13).

C. NEUBERG, Fortgesetzte Untersuchungen über Carboxylase und andere Hefenfermente. Biochem. Z. **71**, 1 (1915).

2) C. NEUBERG, Carboxylase. Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden IV, **1**, 568.

3) C. NEUBERG, Über die Vergärungsgeschwindigkeit der Brenztraubensäure und damit zusammenhängende Fragen. Biochem. Z. **180**, 476 (1927).

Und später gibt er die Erklärung, weshalb Kaliumpyruvinat zum Teil in Gärung versetzt werden kann<sup>1)</sup>: „nämlich insoweit als es durch saure Puffer des Zellinhalts in die Reaktionsform verwandelt wird“.

Es schien mir wünschenswert zu untersuchen, ob Alkali einen ähnlichen Einfluss ausübt auf die Geschwindigkeit der Brenztraubensäurevergärung durch Presshefe.

### III. Versuch.

(Für diese Messungen wurde die Brenztraubensäure in vacuo fraktioniert).

Eine Suspension von 5 g Presshefe<sup>2)</sup> in Wasser wurde mit 1 g Brenztraubensäure und 0, bzw. 1, 2, 3, 4, 5, 10 ccm n-KOH versetzt, und das Volumen mit Wasser verdünnt auf 100 ccm. Zum Vergleich führe ich einen Gäransatz mit 1 % Traubenzucker an. Die Gärungen wurden bei 36° C vorgenommen.

III. TABELLE A zeigt die Ergebnisse.

Nach beendeter Vergärung wurde durch Hinzufügung von konzentrierter Salzsäure die zurückgehaltene Kohlensäure ausgetrieben, und aus der Gesamtmenge Kohlensäure muss man also die Schlussfolgerung ziehen, dass (der Äpfelsäurevergärung durch Schiz. Pombe entsprechend) *Kaliumpyruvinat nicht vergoren wird*.

Aus III. TABELLE A kann die Gärgeschwindigkeit pro 5 Minuten gefunden werden (siehe III. TABELLE B).

Aus diesen Tabellen geht hervor, dass im Gegensatz zu der Äpfelsäurevergärung die Brenztraubensäurevergärung nicht beschleunigt wird durch teilweises Neutralisieren; die Carboxylase hat sein Optimum bei höherem Säuregrad als das Enzym, welches die Äpfelsäurevergärung bewirkt.

Nach KLUYVER<sup>3)</sup> werden Lösungen von 1 % Brenztraubensäure und 1 % Traubenzucker gleich schnell vergoren; dies ist insofern richtig, dass die Brenztraubensäurevergärung

1) I. c. 3) S. 14, 478.

2) In allen Versuchen mit Presshefe ist „Koningsgist“ der „Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek“ zu Delft benutzt worden.

3) A. J. KLUYVER, Biochemische suikerbepalingen. Diss. Delft, 1914, 141.

III. TABELLE A.

Nach 5 Min.	Abgelesenes Volumen CO <sub>2</sub> in ccm.						10 ccm n-KOH	1 % Traubenzucker
	0 ccm n-KOH	1 ccm n-KOH	2 ccm n-KOH	3 ccm n-KOH	4 ccm n-KOH	5 ccm n-KOH		
"	56	56	51	54	54	48	53	50
"	83	81	73	75	71	65	60	84
"	104	101	91	92	85	79	66	120
"	121	117	107	107	98	91	70	157
"	134	131	121	118	106	100	74	185
"	146	143	131	129	115	108	77	195
"	.	.	.	.	.	.	.	.
"	.	.	.	.	.	.	.	.
"	.	.	.	.	.	.	.	.

Am Ende der Vergärung nach dem Ansäuern:  
242

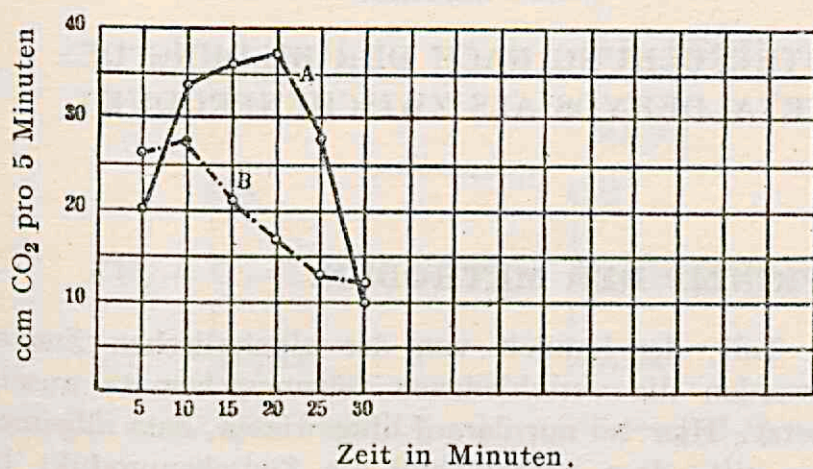
92

183

III. TABELLE B.

Nach 5 Min.	Gärungsgeschwindigkeit in ccm CO <sub>2</sub> .						10 ccm n-KOH	1 % Traubenzucker
	0 ccm n-KOH	1 ccm n-KOH	2 ccm n-KOH	3 ccm n-KOH	4 ccm n-KOH	5 ccm n-KOH		
"	26	—	—	—	—	—	—	20
"	27	25	22	21	17	17	7	34
"	21	20	18	17	14	14	6	36
"	17	16	16	15	13	12	4	37
"	13	14	14	11	8	9	4	28
"	12	12	10	11	9	8	3	10
"	.	.	.	.	.	.	.	.
"	.	.	.	.	.	.	.	.
"	.	.	.	.	.	.	.	.

anfangs ungefähr ebenso schnell verläuft, aber bald nachlässt, wie aus Figur 1 ersichtlich ist. Wahrscheinlich muss dies dem schädigenden Einfluss von freier Brenztraubensäure auf die



Figur 1.

Verlauf der Gärgeschwindigkeiten bei Vergärung von 1% iger Glucose- und 1% iger Brenztraubensäurelösung durch Presshefe.

A = 1% Glucose,

B = 1% Brenztraubensäure.

Wirkung der Carboxylase zuzuschreiben sein <sup>1)</sup>. Diese Schädigung tritt bei der Äpfelsäurevergärung nicht auf. Die Brenztraubensäure ist eine sehr stark dissoziierte Säure, was in der Dissoziationskonstante:  $K = 5,6 \times 10^{-1}$  zum Ausdruck kommt. Der entsprechende Wert für Äpfelsäure beträgt  $4 \times 10^{-4}$ .

1) C. NEUBERG, Biochem. Z. **71**, 70 (1915).

#### IV. KAPITEL.

### UNTERSUCHUNG NACH DER BILDUNG DES ACETALDEHYDS ALS ZWISCHENPRODUKT.

---

#### § 1. PRINZIP DER METHODEN.

Im II. Teil, der handelt von der alkoholischen Zuckergärung, werden die verschiedenen Gärungsschemata auseinandergesetzt. Hier sei nur darauf hingewiesen, dass allgemein als sicher gilt, dass Acetaldehyd als Zwischenprodukt bei dieser Umsetzung auftritt, nachdem es NEUBERG und seinen Schülern gelang mittels Abfangmittel den Acetaldehyd festzulegen.

NEUBERG und FÄRBER <sup>1)</sup> fanden dass, im Gegensatz zu der freien schwefligen Säure und zu den sauren Sulfiten, die neutralen schwefligsauren Salze derart ungiftig sind, dass in ihrer Gegenwart eine beträchtliche Zuckermenge vergoren werden kann durch eine kleine Quantität Hefe.

Danach versuchten NEUBERG und REINFURTH <sup>2)</sup> mit diesen Salzen den Acetaldehyd zu fixieren, und es gelang ihnen Mengen Acetaldehyd und Glycerin bis 73 % der theoretisch möglichen Mengen zu isolieren.

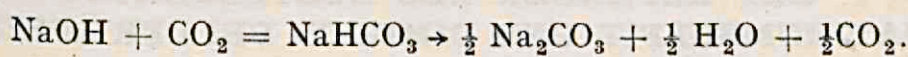
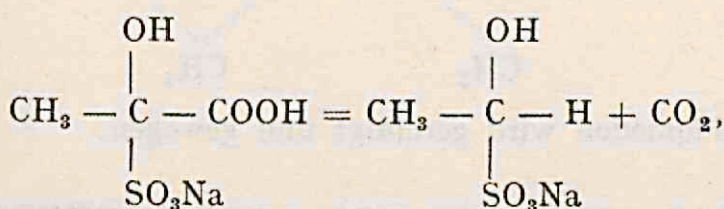
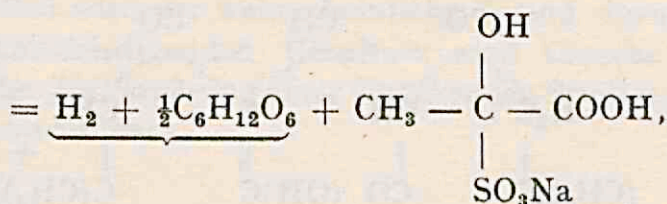
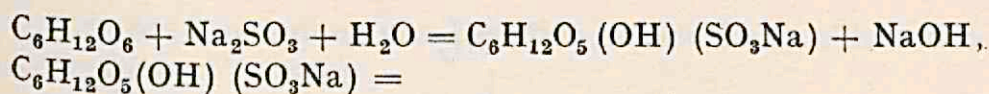
Die Reaktionen, welche in dem Gärgut vorsichgehen, sollen wir uns nach NEUBERG <sup>3)</sup> wie folgt formulieren:

---

1) C. NEUBERG und E. FÄRBER, Über den Verlauf der alkoholischen Gärung bei alkalischer Reaktion. *Biochem. Z.* **78**, 238 (1917).

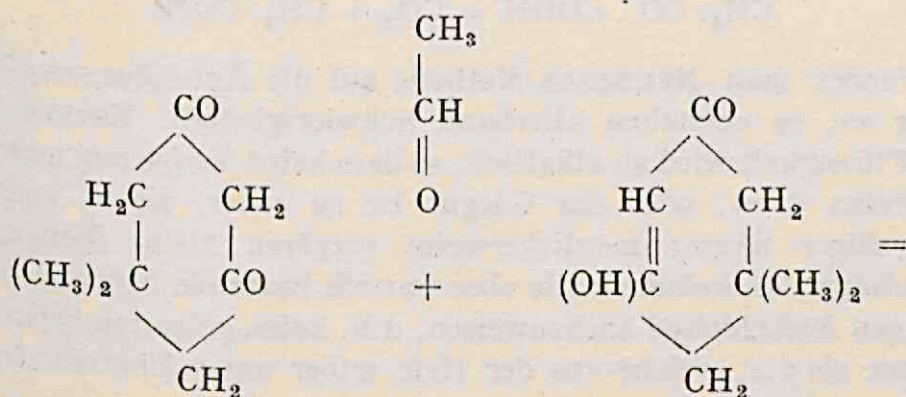
2) C. NEUBERG und E. REINFURTH, Die Festlegung der Aldehydstufe bei der alkoholischen Gärung. *Biochem. Z.* **89**, 365 (1918); Natürliche und erzwungene Glycerinbildung bei der alkoholischen Gärung. *Biochem. Z.* **92**, 234 (1918); Weitere Untersuchungen über die korrelative Bildung von Acetaldehyd und Glycerin bei der Zuckerspaltung und neue Beiträge zur Theorie der alkoholischen Gärung. *Ber.* **52**, 1677 (1919).

3) C. NEUBERG und M. KOBEL, Abfangverfahren. *ABDERHALDEN, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden IV*, **1**, 593.

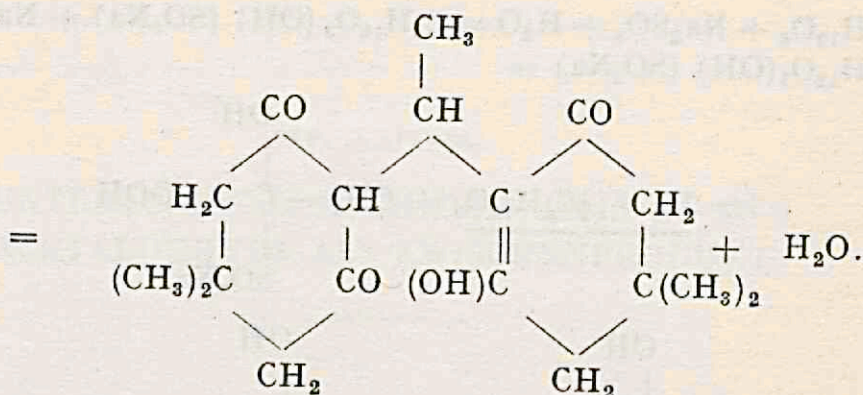


Nach Beendigung der Gärung kann man den Acetaldehyd freimachen und quantitativ bestimmen.

NEUBERG und REINFURTH <sup>1)</sup> haben noch eine andre Methode ausgearbeitet um Acetaldehyd festzulegen. Diese gründet sich auf die Tatsache, dass der Aldehyd sich leicht kondensiert mit 2 Mol Dimethyl-hydro-resorcin (Dimethyl-cyclo-hexandion), der Kürze halber Dimedon genannt, unter Abspaltung von 1 Mol Wasser zum Aldomedon, während Zucker zu keiner Umsetzung mit Dimedon imstande ist.



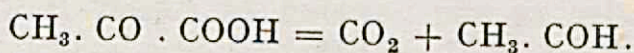
1) C. NEUBERG und E. REINFURTH, Ein neues Abfangverfahren und seine Anwendung auf die alkoholische Gärung. Biochem. Z. **106**, 281 (1920).



Das Aldomedon wird gereinigt und gewogen.

## § 2. DAS ABFANGEN DES ACETALDEHYDS MIT NATRIUMSULFIT UND DIMEDON BEI DER ÄPFEL-SÄUREVERGÄRUNG.

Zu der Sulfitgärung der Brenztraubensäure ist die Zugabe eines Puffers erforderlich wegen der starken Acidität dieser Säure. In dieser Weise gelang es NEUBERG bei der Vergärung der Brenztraubensäure den Acetaldehyd in grosser Menge zu isolieren <sup>1)</sup> (91 % der theoretischen Menge). Nach meiner Ansicht vergisst obengenannter Untersucher, dass bei der Brenztraubensäurevergärung der Aldehyd *Endprodukt* ist, so dass hier von „Abfangen“ gar nicht die Rede sein kann:



Wendet man NEUBERGS Methode auf die Äpfelsäurevergärung an, so entstehen allerhand Schwierigkeiten. Entweder die Flüssigkeit wird zu alkalisch, so dass keine Vergärung mehr eintreten kann, oder das Gärgut ist zu sauer, riecht nach schwefliger Säure; möglicherweise vergären kleine Mengen Äpfelsäure. In keinem Falle aber war ich imstande bedeutende Mengen Acetaldehyd nachzuweisen, d.h. keine grösseren Quantitäten als die, welche aus der Hefe selber unter Einfluss des Sulfits entstehen können.

1) C. NEUBERG und E. REINFURTH, Über die Vergärbarkeit der Brenztraubensäure unter den Bedingungen des Abfangverfahrens. Ber. 53, 1039 (1920).

Auch bei Anwendung von Dimedon konnte kein Aldomedon „abgefangen“ werden.

Im II. Teil wird der wahrscheinliche Grund dazu erörtert.

Diese unbefriedigenden Resultate sind Ursache, dass die alkoholische Zuckergärung einer eingehenden Studierung unterzogen werden musste.

---



## II. THEIL.

### DIE ALKOHOLISCHE ZUCKERGÄRUNG.



## I. KAPITEL.

### DIE BESTEHENDEN AUFFASSUNGEN ÜBER DEN CHEMISMUS DER ALKOHOLISCHEN ZUCKERGÄRUNG.

---

Anfangs suchte man den Gärchemismus in einer einzigen chemischen Gleichung zu schreiben. Weil die Mengen der gebildeten Endprodukte mit den äussern Umständen wechseln, befriedigte eine derartige Schreibweise nicht.

Andre Untersucher nahmen an, dass jedes Endprodukt aus einem einzigen Prozesse entstand.

Zwischen diesen beiden Auffassungen steht die Ansicht, dass man den Gärungsprozess aufzufassen hat als eine Reihenfolge verschiedener Reaktionen, die ineinander greifen. Dies ist die heute fast allgemein gültige Vorstellung.

Nachdem NEUBERG und seine Mitwirker 1912 dargetan haben, dass die Hefe imstande ist Brenztraubensäure unter Bildung von Acetaldehyd und Kohlensäure zu zerlegen, und es ihnen gelang unter Benutzung von Abfangmitteln grosse Mengen Acetaldehyd zu isolieren, hat man allgemein NEUBERGS Ansicht beigestimmt, dass man die Brenztraubensäure als die Muttersubstanz des Aldehyds betrachten soll, und dieser Acetaldehyd bei der normalen alkoholischen Gärung zu Äthylalkohol reduziert wird.

Fast allgemein nimmt man mit NEUBERG <sup>1)</sup> an, dass die Brenztraubensäure aus dem Methylglyoxal hervorgeht; nach LEBEDEW <sup>2)</sup> aber ist die Vorstufe der Brenztraubensäure Glycerinsäure. KOSTYTSCHEW <sup>3)</sup> dagegen war ursprünglich der Ansicht, dass das Zuckermolekül in irgendeiner Weise 2 Mol

---

1) Eine Liste der Abhandlungen NEUBERGS in A. HARDEN, *Alcoholic Fermentation*.

W. FUCHS, *Der gegenwärtige Stand des Gärungsproblems*.

2) A. v. LEBEDEW, Über den Chemismus der alkoholischen Gärung. *Ber.* **47**, 667 (1914); *Z. physiol. Chem.* **132**, 285 (1924).

3) S. KOSTYTSCHEW, Bildung von Acetaldehyd bei der alkoholischen Zuckergärung. *Ber.* **45**, 1289 (1912); Über Alkoholgärung. *Z. physiol. Chem.* **79**, 130, 359 (1912).

Brenztraubensäure liefert neben 4 labilen Wasserstoffatomen, welche, nachdem sie „vorläufig aufgehoben“ sind, die Reduktion des der Brenztraubensäure entstammenden Acetaldehyds bewirken. Später ist KOSTYTCHEW <sup>1)</sup> anderer Meinung geworden, und nimmt er jedenfalls an, dass Brenztraubensäure aus Methylglyoxal hervorgeht.

Die Theorie von KLUYVER, DONKER und VISSER 'T HOOFT <sup>2)</sup> gründet sich auf den Gedanken, dass alle Teilprozesse der Zuckerzersetzung nichts anderes sind als gekuppelte Dehydrierungs- und Hydrierungsvorgänge (die Idee entstammt einer Vereinigung der WIELANDSchen und WARBURGSchen Ansichten). Dieser Formulierung liegt, was betrifft die „vorläufige Aufhebung“ der Wasserstoffatome, ein ähnlicher Gedanke als der KOSTYTCHESchen zugrunde. Andererseits entspricht sie ganz der NEUBERGSchen Theorie. Für die alkoholische Gärung nehmen die drei Untersucher an, dass die Bildung der Brenztraubensäure beruht auf einer Dehydrierung des Methylglyoxalhydrats. Die Carboxylase zerlegt Brenztraubensäure in Acetaldehyd und Kohlensäure; der Acetaldehyd tritt als Wasserstoffacceptor auf, und wird reduziert zu Äthylalkohol.

Dieser Gedanke ist zu einer allgemeinen Theorie des Chemismus der Dissimilationsprozesse erweitert worden: nach KLUYVER und DONKER <sup>3)</sup> hat das Protoplasma gegenüber Wasserstoff eine bestimmte Affinität, abhängig von der Protoplasma-art der Organismen. Je nach der Grösse dieser Affinität können Wasserstoffatome in den Substratmolekülen mehr oder weniger aktiviert werden.

Der aktivierte Wasserstoff kann entweder an eine andere Stelle des Moleküls gebunden werden, oder einen Acceptor

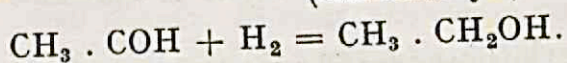
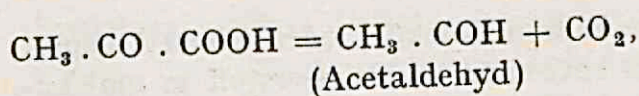
1) S. KOSTYTCHEW und S. SOLDATENKOV, Über Alkoholgärung. Z. physiol. Chem. **168**, 128 (1927).

(C. NEUBERG und M. KOBEL, Vermeintliche Abfangung von Methylglyoxal bei der alkoholischen Gärung. Biochem. Z. **191**, 472 (1927).)

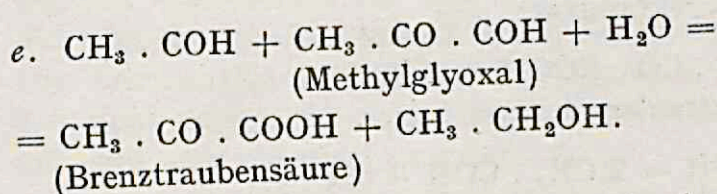
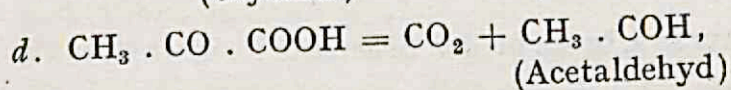
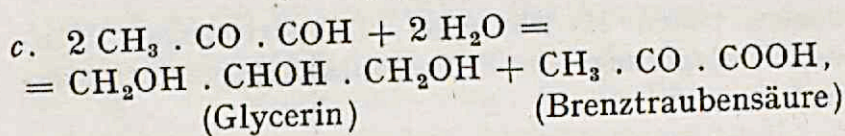
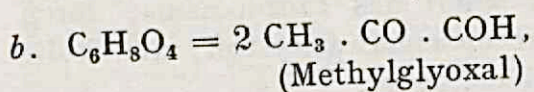
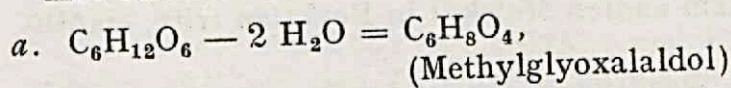
2) A. J. KLUYVER, H. J. L. DONKER und F. VISSER 'T HOOFT, Über die Bildung von Acetylmethylcarbinol und 2,3-Butylenglykol im Stoffwechsel der Hefe. Biochem. Z. **161**, 361 (1925).

3) A. J. KLUYVER und H. J. L. DONKER, De eenheid in het chemisme van de fermentatieve suikerdissimilatieprocessen der microben. Verslag Akad. Wetenschappen Amsterdam **33**, 895 (1924); De katalytische overdracht van waterstof als kern van het chemisme der dissimilatieprocessen der microben. I. c. **34**, 237 (1925); Die Einheit in der Biochemie. Chem. d. Zelle u. Gewebe **13**, 134 (1926).





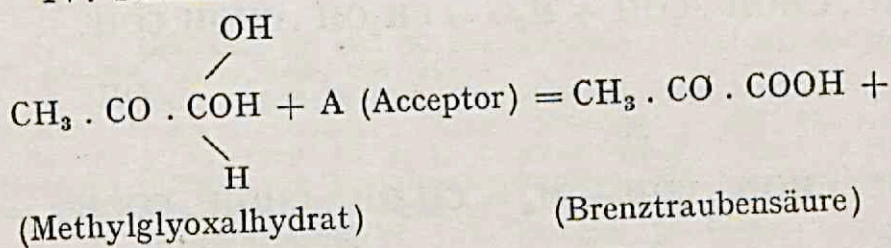
III. Schema von NEUBERG:



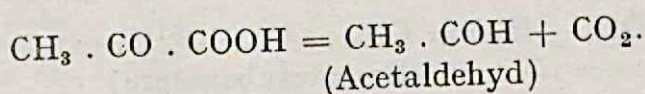
Um obenerwähnte Reaktionen zustandezubringen nimmt NEUBERG die Existenz folgender Enzyme an:

- Für *a.* die Dehydratase,  
 „ *b.* „ Depolymerase,  
 „ *c.* „ Dismutase,  
 „ *d.* „ Carboxylase,  
 „ *e.* „ Dismutase.

IV. Schema von KLUYVER, DONKER und VISSER 't HOOFT:



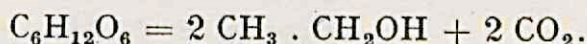
+ AH (Acceptorwasserstoff),



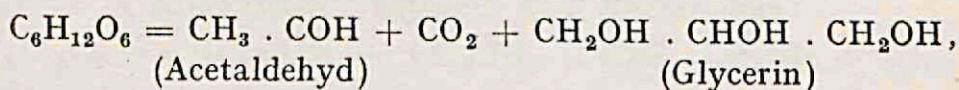
Normalerweise ist  $A = \text{Acetaldehyd}$ .

Über die NEUBERGSche Theorie möge bemerkt werden, dass NEUBERG sich jede erdenkliche Mühe gegeben habe, die Gärung in andre Wege zu leiten, weil er die in sein System bezogenen Zwischenprodukte zu isolieren versuchte. So unterscheidet NEUBERG fünf Vergärungsformen, auf welche ich in den folgenden Kapiteln noch zurückkomme.

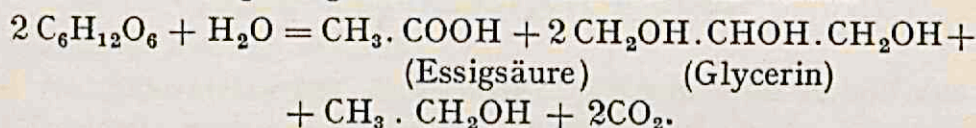
Die erste Vergärungsform ist die normale Zerlegung:



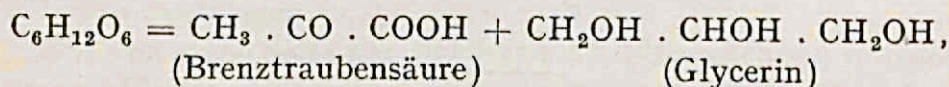
Die zweite Vergärungsform tritt im Falle der Sulfitgärung in Erscheinung:



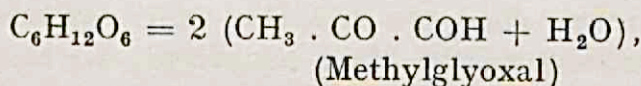
die dritte Vergärungsform unter Einfluss von Alkali:



Die vierte Vergärungsform:



und die fünfte:



beruhen auf der Möglichkeit die Cozymasefraktion der Zymase, welche die Funktion der Co-phosphatase und der Co-mutase besitzt, zu lähmen, so dass bloss die Wirkung der Apozymase übrigbleibt.

NEUBERG findet statt Methylglyoxal Brenztraubensäure, wenn er entweder die Menge des Enzyms vergrößert, oder (was nach seiner Meinung auf eins hinauskommt) die Zeitdauer des Versuchs verlängert.

Nach dem Schema von KLUYVER, DONKER und VISSER 't Hooft kann die Entstehung des Glycerins bei der zweiten Vergärungsform nach meiner Ansicht nicht erklärt werden.

Man muss doch annehmen, dass diese Untersucher das Abfangen des Aldehyds bei der Sulfitgärung als Beweis für das Auftreten des Acetaldehyds als Zwischenprodukt bei der alkoholischen Zuckergärung gelten lassen <sup>1)</sup>. Die Mengen Acetaldehyd und Glycerin entstehen im Verhältnis 1 : 1. Als Quelle des Glycerins dient der Methylglyoxal, der in diesem Falle als Wasserstoffacceptor des Wasserstoffs, der normalerweise durch den Acetaldehyd acceptiert wird, auftreten soll. Der Methylglyoxal soll sowohl Wasserstoffacceptor als Wasserstoffdonator sein!

---

1) A. J. KLUYVER und H. J. L. DONKER, De eenheid in het chemisme van de fermentatieve suikerdissimilatieprocessen der microben. Verslag Akad. Wetenschappen Amsterdam **33**, 901 (1924).

## II. KAPITEL.

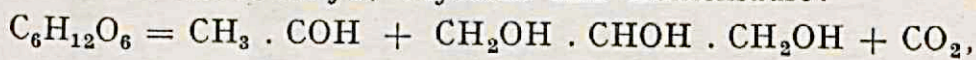
### DIE ZWEITE VERGÄRUNGSFORM ANGEWANDT AUF GÄRUNGEN MIT LEBENDER HEFE.

---

#### § 1. DIE SULFITGÄRUNG.

##### *A. Natriumsulfit als Abfangmittel.*

Wie im II. Teil I. Kap. schon behandelt worden ist, vollzieht die zweite Vergärungsform sich nach NEUBERG durch Zuckerzerfall in Acetaldehyd, Glycerin und Kohlensäure:



während in der Praxis die erste Vergärungsart:



neben der zweiten verläuft.

NEUBERG stellte fest, dass in Gegenwart von Sulfit verlaufende Gärungen grosse Quantitäten Acetaldehyd und Glycerin liefern<sup>1)</sup>; durch Nachprüfung konnte ich seine Resultate vollkommen bestätigen.

Nur von einer Seite hat NEUBERG die Untersuchung insoweit vernachlässigt, dass er die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung nie studiert hat, während mir deutlich geworden ist, dass letztere Vieles erläutert was nach meiner Ansicht mit NEUBERGS Gärungstheorie nicht erklärt werden kann.

Die Ausführung der Gärversuche war wie auf Seite 7 beschrieben. Die Benutzung einer Schüttelmaschine hat den Vorteil dass die Gärungen regelmässig stattfinden.

#### **Versuch IV.**

Die Zusammensetzung der Ansätze war:

3, bzw. 4, 5, 6 g Rohrzucker,

1½ g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>,

5 g Presshefe,

100 ccm Wasser.

Die Gärungen verliefen bei 36° C.

---

1) Siehe diese Diss. 18.

Jedesmal nach fünf Minuten wurden die entwickelten ccm Kohlensäure abgelesen; die Menge Kohlensäure, welche jede Viertelstunde entstanden ist, zeigt folgende Tabelle.  
(Die Sulfitlösung war im voraus mit Kohlensäure gesättigt.)

TABELLE IV.

Gärgeschwindigkeit in ccm CO<sub>2</sub>.

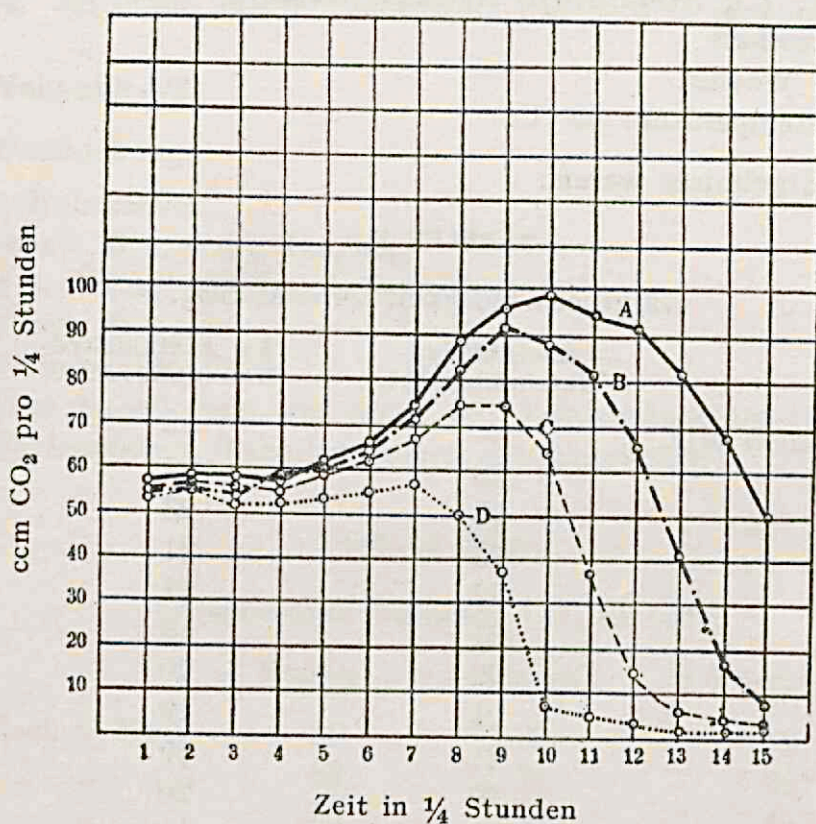
	6 g Sacch.	5 g Sacch.	4 g Sacch.	3 g Sacch.
Nach $\frac{1}{4}$ Stunde	56	55	55	54
" " "	58	56	57	55
" " "	58	54	56	52
" " "	57	58	55	52
" " "	61	60	59	53
" " "	66	65	62	54
" " "	74	72	67	57
" " "	89	82	74	50
" " "	96	92	74	37
" " "	98	88	63	7
" " "	94	81	38	4
" " "	91	66	14	3
" " "	81	41	6	1
" " "	67	17	4	1
" " "	50	8	3	1
" " "	.	.	.	.
" " "	.	.	.	.
" " "	.	.	.	.

Auf Grund dieser Zahlen ist die folgende graphische Darstellung ausgeführt worden, welche ein deutliches Bild des Gärverlaufs gibt. Die Zeit und das Kohlensäurevolumen sind als Koordinaten gewählt.

Die 4 Kurven demonstrieren, dass im Anfang die Gärgeschwindigkeiten sich nahezu nicht ändern, während sie sich später erheben, so dass es den Eindruck macht alsob die Sulfit- und Zuckergärung zwei verschiedene Prozesse sind, welche aufeinanderfolgend verlaufen. Es scheint denkbar, dass der Zucker in Aldehyd, Kohlensäure und Glycerin zerfällt, bis das Sulfit soweit unschädlich gemacht ist (durch Bindung von

Aldehyd), dass der Zucker normalerweise vergoren werden kann.

Acetaldehyd-Natriumbisulfit hat durchaus keinen Einfluss auf die Gärungsgeschwindigkeit, sowie Versuch V zeigt. Dieses Additionsprodukt wurde gewonnen, indem der Acetaldehyd in der Kälte mit einer konzentrierten Lösung von



Figur 2.

Verlauf der Gärgeschwindigkeiten bei Vergärung von  $\pm 6\%$ , bzw.  $\pm 5\%$ ,  $\pm 4\%$ ,  $\pm 3\%$  Saccharose bei Gegenwart von  $\pm 1\frac{1}{4}\%$   $\text{Na}_2\text{SO}_3$  durch Presshefe.

A =  $\pm 6\%$  Saccharose,  
 B =  $\pm 5\%$  „  
 C =  $\pm 4\%$  „  
 D =  $\pm 3\%$  „

Natriumbisulfit geschüttelt wurde. Nach Hinzufügung von absolutem Alkohol fiel die Aldehydverbindung aus. Durch Aufnehmen in wenig Wasser und nach genauer Ausfällung mit absolutem Alkohol unter Zusatz von einigen Tropfen Äther wurde die Verbindung abgesaugt, mit absolutem Alkohol

und Äther gewaschen, und in einem Exsiccator über Chlorcalcium getrocknet.

### Versuch V.

Beschickung:

3 g Rohrzucker,

0, bzw.  $\frac{1}{2}$  g Acetaldehyd-Natriumbisulfit,

$2\frac{1}{2}$  g Presshefe,

50 ccm Wasser.

Gärungstemperatur:  $36^{\circ}$  C.

Die Ergebnisse waren:

TABELLE V.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

	— Acetaldehyd- Natriumbisulfit.	$\frac{1}{2}$ g Acetaldehyd- Natriumbisulfit.
Nach 5 Min.	—	—
" " "	23	24
" " "	25	23
" " "	23	21
" " "	23	21
" " "	21	19
" " "	22	20
" " "	21	19
" " "	21	19
" " "	20	20
" " "	18	18
" " "	20	18
" " "	.	.
" " "	.	.
" " "	.	.

Acetaldehyd-Natriumbisulfit beschleunigt die Gärung also nicht. Geringe Mengen  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  wirken hemmend, z.B. 0.1 % (siehe Tabelle VI A und B, und Figur 3).

Wird mehr als  $1\frac{1}{4}$  g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  zugesetzt, so zeigt die Kurve der Gärgeschwindigkeit von Anfang an einen Abfall, und verläuft während der ersten Stunde nicht, wie in Figur 2, fast geradlinig.

Sollen die Kurven der 2. Figur zwei Prozessen zugeschrieben werden, die aufeinanderfolgend verlaufen, dann kann man sich theoretisch den Fall denken, dass die Zusammenwirkung von Sulfit- und Zuckergärung zu einer optimalen Gärgeschwindigkeit führt, welche diejenige der Zuckergärung überschreitet. Tatsächlich konnte dieser Gedanke verwirklicht werden, und zwar bei einer Sulfitkonzentration die  $\pm \frac{1}{2} \%$  entsprach:

### Versuch VI.

Beschickung:

6 g Rohrzucker,  
0, bzw. 0.1, 0.5 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  
5 g zentrifugierte Presshefe,  
100 ccm Wasser.

Gärtemperatur:  $36^\circ \text{C}$ .

(Die Sulfitlösung war nicht mit Kohlensäure gesättigt.)

Nachstehende Tabellen zeigen die Ergebnisse:

TABELLE VI A.

Abgelesenes Volumen  $\text{CO}_2$  in ccm.

	— $\text{Na}_2\text{SO}_3$	0.1 g $\text{Na}_2\text{SO}_3$	0.5 g $\text{Na}_2\text{SO}_3$
Nach 5 Min.	38	35	8
" " "	83	71	20
" " "	130	111	43
" " "	174	153	71
" " "	217	194	100
" " "	259	233	131
" " "	300	270	163
" " "	341	304	197
" " "	382	338	234
" " "	421	372	274
" " "	460	405	315
" " "	500	439	358
" " "	540	472	402
" " "	579	505	450
" " "	616	537	495

	— $\text{Na}_2\text{SO}_3$	0.1 g $\text{Na}_2\text{SO}_3$	0.5 g $\text{Na}_2\text{SO}_3$
Nach 5 Min.	652	570	540
" " "	687	.	585
" " "	722	.	628
" " "	756	.	671
" " "	790		712
" " "	822		753
	.		.
	.		.
	.		.

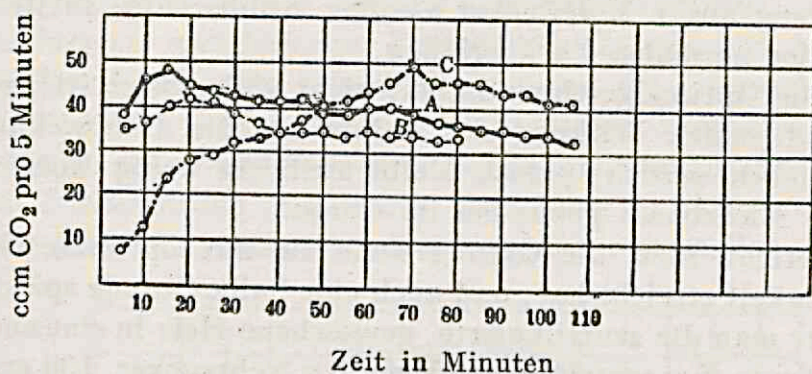
Hieraus abgeleitet:

TABELLE VI B.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

	— $\text{Na}_2\text{SO}_3$	0.1 g $\text{Na}_2\text{SO}_3$	0.5 g $\text{Na}_2\text{SO}_3$
Nach 5 Min.	38	35	8
" " "	45	36	12
" " "	47	40	23
" " "	44	42	28
" " "	43	41	29
" " "	42	39	31
" " "	41	37	32
" " "	41	34	34
" " "	41	34	37
" " "	39	34	40
" " "	39	33	41
" " "	40	34	43
" " "	40	33	44
" " "	39	33	48
" " "	37	32	45
" " "	36	33	45
" " "	35	.	45
" " "	35	.	43
" " "	34	.	43
" " "	34		41
" " "	32		41
	.		.
	.		.
	.		.

Figur 3 stellt den Gärverlauf graphisch dar. Nach 70 Minuten hat Kurve C sein Optimum erreicht, das 1 ccm höher liegt als



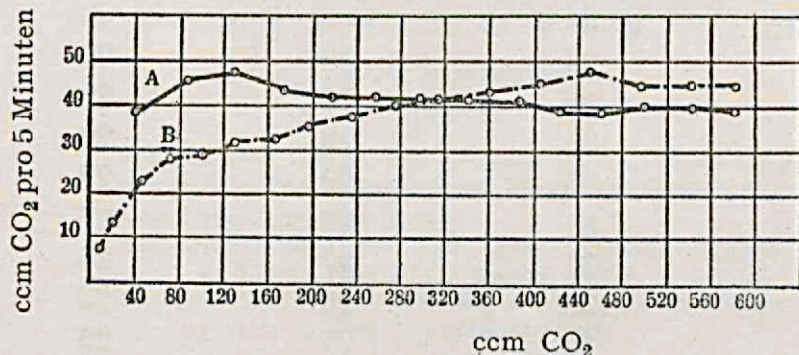
Figur 3.

Verlauf der Gärgeschwindigkeiten bei Vergärung von  $\pm 6\%$  Saccharose bei Gegenwart von 0, bzw.  $\pm 0.1$  en  $\pm 0.5\%$  Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> durch Presshefe.

A = — Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>,  
 B =  $\pm 0.1\%$  „  
 C =  $\pm 0.5\%$  „

das Optimum der Kurve A, das schon nach 15 Minuten erreicht war.

In Figur 4 ist als Abzissen, statt der Zeit die totale Menge



Figur 4.

Verlauf der Gärgeschwindigkeiten bei Vergärung von  $\pm 6\%$  Saccharose bei Gegenwart von 0, bzw.  $\pm 0.5\%$  Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> durch Presshefe.

A = — Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>  
 B =  $\pm 0.5\%$  „

Kohlensäure angegeben, welche sich vom Anfang der Vergärung an entwickelt hat (siehe Tabelle VI A). Daraus ergibt sich, dass Kurve B ihr Optimum erreicht hat nachdem sich 460 ccm, Kurve A nachdem sich 130 ccm Kohlensäure sammelten.

Umgerechnet nach der Zuckerkonzentration sollte das Optimum von B noch mehr nach rechts liegen, weil ja infolge der Sulfitgärung aus 1 Mol Zucker weniger Kohlensäure entsteht als bei der normalen Zuckergärung.

Dass die Optimalgeschwindigkeit nicht viel grösser ist, soll der schädigenden Wirkung des Sulfits auf die Hefewirkung zugeschrieben werden; jedoch bleibt auch ein wenig Kohlensäure als Bicarbonat gebunden im Gärgut.

Unterbricht man die Gärung wenn sie ihre optimale Geschwindigkeit erreicht hat, und auch eine halbe Stunde später, und führt man die zentrifugierte, gewaschene Hefe in eine neue Zuckerlösung (5 g zentrifugierte Hefe, 6 g Rohrzucker, 100 ccm Wasser), dann zeigen Tabelle VI C und Figur 5, dass von erhöhter Gärkraft der Hefe nicht die Rede ist.

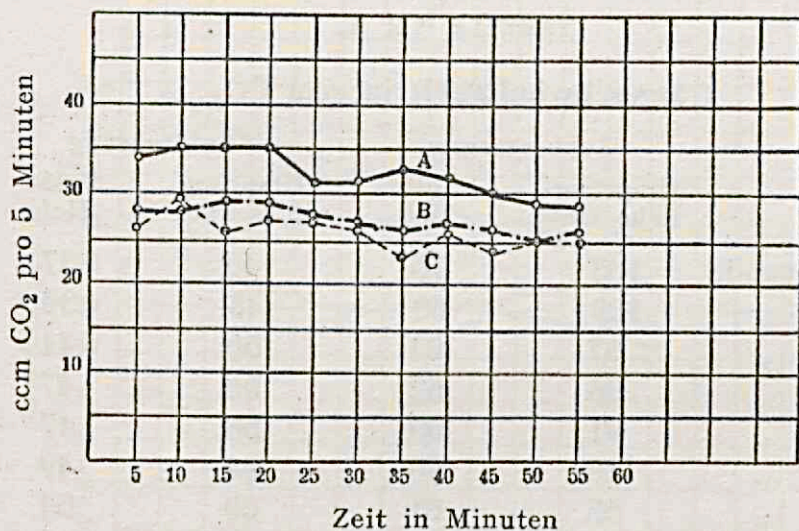
TABELLE VI C.  
Gärgeschwindigkeit in ccm CO<sub>2</sub>.

	Ursprüngliche Hefe.	Hefe abzentri- fugiert bei ihrer Optimalge- schwindigkeit.	Hefe abzentri- fugiert $\frac{1}{2}$ Stunde nach ihrer Optimal- geschwindigkeit.
Nach 5 Min.	—	—	—
" " "	34	28	26
" " "	35	28	29
" " "	35	29	26
" " "	35	29	27
" " "	31	28	27
" " "	31	27	26
" " "	33	26	23
" " "	32	27	26
" " "	30	26	24
" " "	29	25	25
" " "	29	26	25
	.	.	.
	.	.	.
	.	.	.

Es zeigt sich also, dass der Hefe schon geschadet ist durch Gärung in Gegenwart von  $\frac{1}{2}$  % Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Die optimale Gärgeschwindigkeit der normalen Zuckergärung ist erreicht worden

nachdem 130 ccm Kohlensäure entwickelt sind. Das ebenso hohe Optimum der Sulfitgärung liegt bei 460 ccm. *Die Erklärung dieser Befunde ist nur möglich wenn man annimmt, es handle sich hier um zwei Prozesse.* Vorausgeschickt sei, dass Acetaldehyd-Natriumbisulfit keinen Einfluss auf die Gärgeschwindigkeit hat, und geringe Mengen  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  schon hemmend wirken.

Auch noch in anderer Weise lässt sich dartun, dass die Sulfit- und Zuckergärung in keinerlei Beziehung zu einander stehen; dazu seien die nachstehenden Versuche mitgeteilt.



Figur 5.

Verlauf der Gärgeschwindigkeiten bei Vergärung von  $\pm 6\%$  Saccharose durch Press- und Sulfithefe.

A = Ursprüngliche Hefe,

B = Sulfithefe, die eine gute Stunde mittels  $\pm 0.5\%$   $\text{Na}_2\text{SO}_3$  gegoren hat,

C = Sulfithefe, die noch eine Stunde länger mittels  $\pm 0.5\%$   $\text{Na}_2\text{SO}_3$  gegoren hat.

## Versuch VII.

Dieser Versuch wurde so durchgeführt, dass mehrere Kolben zur Anwendung kamen, die beschickt waren mit:

1.8 g Rohrzucker,

$1\frac{1}{4}$  g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,

5 g zentrifugierte Presshefe,

100 ccm Wasser.

Gärtemperatur:  $36^\circ \text{C}$ .

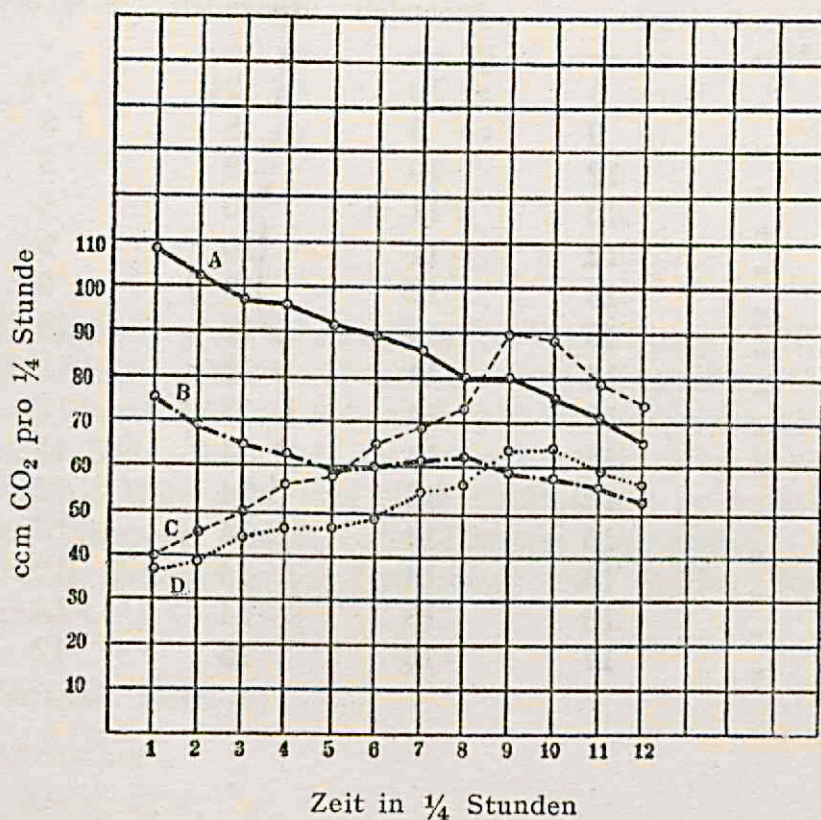
Nach gut zwei Stunden wurde die Hefe abzentrifugiert und gewaschen; sie war nun grau, von dünner Konsistenz, und hatte einen unangenehmen Geruch (diese Hefe wird fortan von mir „Sulfithefe“ genannt). Ihre Sulfit- (6 g Rohrzucker,  $1\frac{1}{4}$  g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 5 g zentrifugierte Hefe, 100 ccm Wasser) und Zuckergärung (6 g Rohrzucker, 5 g zentrifugierte Hefe, 100 ccm Wasser) verglichen mit derjenigen der ursprünglichen Hefe demonstrieren Tabelle VII A und Figur 6.

TABELLE VII A.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

	Zuckergärung		Sulfitgärung	
	Ursprüngliche Hefe	Sulfit-Hefe	Ursprüngliche Hefe	Sulfit-Hefe
Nach $\frac{1}{4}$ Stunde	108	75	40	37
„ „ „	103	69	45	39
„ „ „	97	64	50	44
„ „ „	96	62	56	47
„ „ „	91	59	58	47
„ „ „	89	60	64	49
„ „ „	86	61	69	54
„ „ „	80	62	73	56
„ „ „	80	59	90	63
„ „ „	75	58	88	64
„ „ „	71	56	79	59
„ „ „	66	52	74	56
	.	.	.	.
	.	.	.	.
	.	.	.	.

Figur 6 zeigt, dass die Zuckergärung der Sulfithefe verzögert worden ist, während die Sulfitgärung eine äusserst geringe Schädigung erfuhr. Die Kurven C und D weichen erst dann deutlich auseinander, wenn das Sulfit gebunden ist, und die Zuckergärung allein verläuft.



Figur 6.

Verlauf der Gärgeschwindigkeiten bei Vergärung von  $\pm 6\%$  Saccharose, bzw.  $\pm 6\%$  Saccharose,  $\pm 1\frac{1}{4}\%$   $\text{Na}_2\text{SO}_3$  durch Press- und Sulfithefe.

A = Zuckergärung mit der ursprünglichen Hefe.

B = Zuckergärung mit der Sulfithefe.

C = Sulfitgärung mit der ursprünglichen Hefe.

D = Sulfitgärung mit der Sulfithefe.

Es lag nun auf der Hand zu versuchen, durch wiederholtes Vergären in Gegenwart von  $1\frac{1}{4}$  g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , dem Prozesse der Zuckergärung fortwährend mehr zu schaden (siehe Tabelle VII B für die Sulfitgärung, Tabelle VII C für die Zuckergärung). (Die Sulfitlösung war nicht mit Kohlensäure gesättigt.)

TABELLE VII B.

**Sulfitgärung.**Gärgeschwindigkeit in ccm CO<sub>2</sub>.

	Ursprüng- liche Hefe	Sulfithefe		
		einmal behandelt	zweimal behandelt	dreimal behandelt
Nach 5 Min.	—	—	—	—
" " "	6	10	9½	8½
" " "	9	9	8	8
" " "	12	10	9	8
" " "	12	11	10	8
" " "	12	11	10	9
" " "	13	13	13	9
" " "	15	14	12	10
" " "	16	14	13	11
" " "	15	14	13	12
" " "	16	14	14	11
" " "	16	16	14	12
" " "	16	14	14	13
" " "	16	14	14	12
" " "	18	15	14	13
" " "	17	16	15	12
	.	.	.	.
	.	.	.	.
	.	.	.	.

TABELLE VII C.

**Zuckergärung.**Gärgeschwindigkeit in ccm CO<sub>2</sub>.

	Ursprüng- liche Hefe	Sulfithefe		
		einmal behandelt	zweimal behandelt	dreimal behandelt
Nach 5 Min.	—	—	—	—
" " "	37	25	25	23
" " "	38	26	25	22
" " "	37	24	23	21
" " "	37	25	22	19
" " "	35	24	21	19

	Ursprüng- liche Hefe	Sulfithefe		
		einmal behandelt	zweimal behandelt	dreimal behandelt
Nach 5 Min.	35	24	22	19
" " "	35	23	22	18
" " "	34	22	22	19
" " "	33	23	22	18
" " "	33	22	20	18
" " "	33	23	21	17
" " "	34	22	21	20
	.	.	.	.
	.	.	.	.
	.	.	.	.

Es zeigt sich also, dass wiederholtes Vergären mittels Natrium-sulfit nahezu keine Veränderung in die Gärgeschwindigkeiten bringt. Durch die erste Behandlung leidet die Zymase erheblich; weitere Behandlung ist fast ohne Einfluss. Man kann also, durch die Hefe aufs neue einer Sulfitgärung zu unterwerfen, keine Trennung dieser beiden Prozesse hervorrufen.

Durch Erhöhung der Temperatur wird beiden Prozessen geschadet:

### Versuch VIII.

Beschickung:

4 g Rohrzucker,  
0, bzw.  $1\frac{1}{4}$  g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  
5 g Presshefe,  
100 ccm Wasser.  
Gärtemperatur:  $50^\circ \text{C}$ .

TABELLE VIII.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

	— $\text{Na}_2\text{SO}_3$	$1\frac{1}{4}$ g $\text{Na}_2\text{SO}_3$
Nach 5 Min.	—	—
" " "	54	2
" " "	48	4
" " "	39	5

	— Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	1¼ g Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>
Nach 5 Min.	31	6
" " "	24	6
" " "	19	5
" " "	14	4
" " "	11	3
	.	.
	.	.
	.	.

Dass es die Zymase ist, welche durch die Anwesenheit des Sulfits leidet, geht aus Versuch IX hervor.

### Versuch IX.

Die Ansätze wurden genau wie bei Versuch VII gemacht, aber nach Abzentrifugieren und Waschen der Hefe ist die Traubenzuckervergärung verglichen mit derjenigen der ursprünglichen Hefe:

TABELLE IX.

Gärgeschwindigkeit in ccm CO<sub>2</sub>.

	Ursprüngliche Hefe	Sulfithefe
Nach ¼ Stunde	108	70
" " "	97	64
" " "	90	61
" " "	86	57
" " "	86	56
" " "	82	55
	.	.
	.	.
	.	.

Wichtig war nun zu untersuchen, ob auch die Carboxylase durch Gärung mit derselben Menge Natriumsulfit eine Schädigung erfuhr.

### Versuch X.

Dieser Versuch wurde auf dieselbe Weise durchgeführt wie Versuch VII. Nach Abzentrifugieren und Waschen der Hefe ist die Zucker- (6 g Rohrzucker, 5 g zentrifugierte Hefe, 100 cmm Wasser) und Brenztraubensäurevergärung (0.5 g

Brenztraubensäure, 5 g zentrifugierte Hefe, 100 ccm Wasser) der Sulfithefe verglichen mit der der ursprünglichen Hefe. Die Ergebnisse sind hier tabellarisch wiedergegeben:

TABELLE X.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

	Ursprüngliche Hefe		Sulfithefe	
	Zucker- gärung	Brenztrau- bensäure- gärung	Zucker- gärung	Brenztrau- bensäure- gärung
Nach 5 Min.	—	—	—	—
" " "	48	11	23	9
" " "	34	9	20	9
" " "	33	8	20	8
" " "	33	7	22	8
" " "	33	6	21	6
" " "	.	.	.	.
" " "	.	.	.	.
" " "	.	.	.	.

Der mitgeteilte Versuch lehrt, dass die Sulfithefe noch imstande ist Brenztraubensäure mit derselben Geschwindigkeit als die ursprüngliche Hefe zu zerlegen, was allerdings zu erwarten war, weil die Carboxylase im Vergleich zu der Zymase eine grössere Resistenz gegen Desinfektionsmittel und andersartige Zusätze zeigt <sup>1)</sup>.

Wendet man an Stelle von Presshefe Unterhefe an, dann erhält man ähnliche Resultate. Die Reinzuchtunterhefe der „Heineken's Bierbrouwerij Maatschappij“ <sup>2)</sup> zu Amsterdam und Rotterdam ist in derselben Weise gewonnen worden als die der Schiz. Pombe <sup>3)</sup>. Gleichzeitig wurde diese Unterhefe auch in 5 % igem Glucose-Hefewasser gezüchtet. Nach dem Absetzen sind die Hefemassen abgepresst. Es stellte sich heraus, dass die Vorgeschichte der Hefe eine Rolle spielt: die in Glucose-Hefewasser gezüchtete Hefe vergorschneller als diejenige aus Malzwürze. Auch der Habitus der letzteren war anders, sie

1) C. NEUBERG, Carboxylase. ABDERHALDEN, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden IV, 1, 580.

2) Ich benutze die Gelegenheit der Direktion der „Heineken's Bierbrouwerij Maatschappij“ meinen Dank für die Belieferung mit den benötigten Hefen auszusprechen.

3) Siehe diese Diss. 6.

verteilte sich staubig in der Flüssigkeit, kam schwer zum Absetzen, im Gegensatz zu der in Glucose-Hefewasser gezüchteten Hefe, die zu grossen Flocken zusammentrat.

### Versuch XI.

Beschickung:

6 g Rohrzucker,

$1\frac{1}{4}$  g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,

5 g Unterhefe,

100 ccm Wasser.

Gärungstemperatur:  $36^\circ \text{C}$ .

(Die Sulfitlösung war nicht im voraus mit Kohlensäure gesättigt).

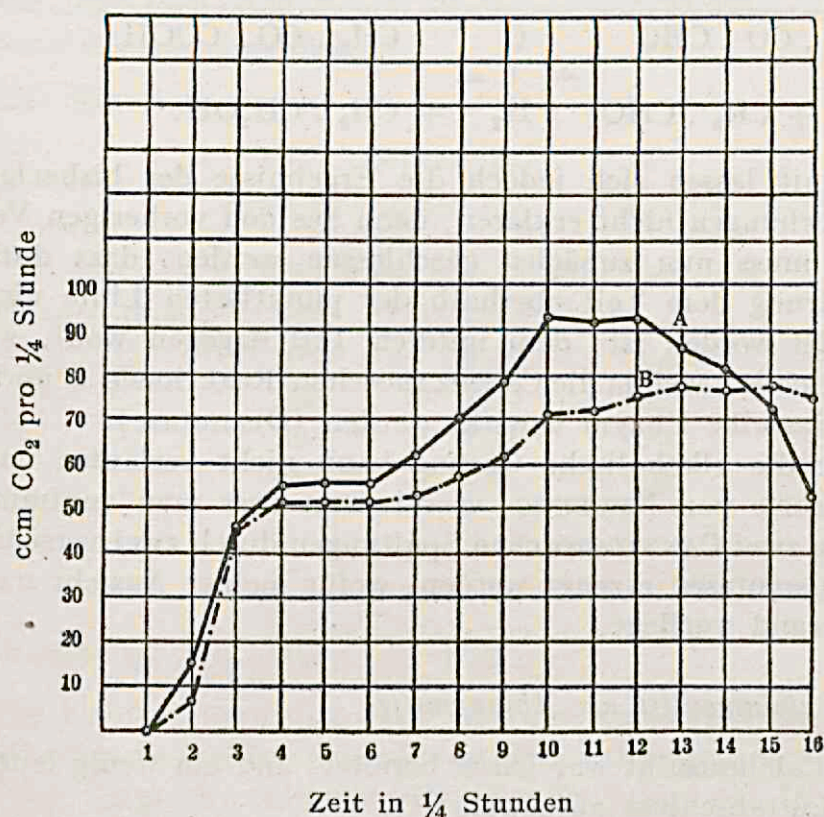
Die Resultate sind eingetragen in Tabelle XI und Figur 7.

TABELLE XI.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

	Unterhefe gezüchtet in Glucose-Hefe- wasser	Unterhefe gezüchtet in Malzwürze
Nach $\frac{1}{4}$ Stunde	0	0
" " "	14	7
" " "	47	46
" " "	54	51
" " "	55	51
" " "	55	51
" " "	62	53
" " "	70	58
" " "	78	62
" " "	93	71
" " "	92	72
" " "	93	75
" " "	87	78
" " "	82	77
" " "	72	78
" " "	52	75
	.	.
	.	.
	.	.

NEUBERG <sup>1)</sup> schreibt dass, für das Arbeiten mit Natriumsulfit die Oberhefen sich viel besser eignen als die Unterhefen, weil letztere empfindlicher sind. Vermutlich hat NEUBERG nicht mit Reinkulturen gearbeitet.



Figur 7.

Verlauf der Gärsgeschwindigkeiten bei Vergärung von  $\pm 6\%$  Saccharose,  $\pm 1\frac{1}{4}\%$   $\text{Na}_2\text{SO}_3$  durch Unterhefe.

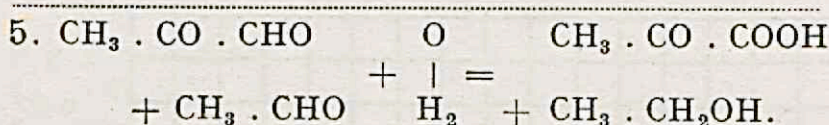
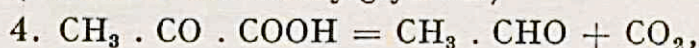
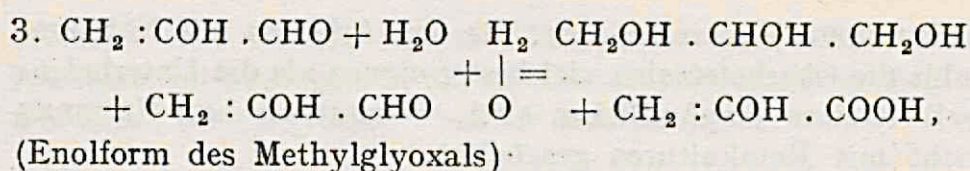
A = Unterhefe in Glucose-Hefewasser,  
B = in Malzwürze gezüchtet.

Hier folgt NEUBERGS Schema <sup>2)</sup>:

1.  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - 2 \text{H}_2\text{O} = \text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{CHO}$ ,
2.  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{CHO} = 2 \text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CHO}$ ,

1) C. NEUBERG und M. KOBEL, Abfangverfahren. ABDERHALDEN, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden IV, 1, 596.

2) Siehe diese Diss. 28.



Hiermit lassen sich jedoch die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen nicht erklären, denn aus den vorherigen Versuchen muss nun zunächst geschlossen werden, dass durch Sulfitgärung dem Teil oberhalb der punktierten Linie nicht geschadet worden ist; dem unteren Teil dagegen wohl, was unmöglich ist, weil ja die CANNIZAROSchen Reaktionen 3 und 5 durch dasselbe Enzym bewirkt werden (Dismutase).

Also: die alkoholische Gärung kann nicht verlaufen nach der Theorie von NEUBERG, es sei denn dass man annimmt, dass die zwei CANNIZAROSchen Spaltungen durch zwei verschiedene Dismutasen erzeugt werden, wofür meiner Ansicht nach kein Grund vorliegt.

### *B. Calciumsulfit als Abfangmittel.*

Das Calciumsulfit war frisch bereitet, und ein wenig feucht unter Luftabschluss aufbewahrt <sup>1)</sup>.

Von den Gärversuchen erwähne ich folgende:

### **Versuch XII.**

Beschickung:

5 g Traubenzucker,  
0, bzw. 3 g CaSO<sub>3</sub> 2 aq.,  
5 g Unterhefe,  
100 ccm Wasser.  
Gärungstemperatur: 36° C.

1) C. NEUBERG und E. REINFURTH, Weitere Untersuchungen über die korrelative Bildung von Acetaldehyd und Glycerin bei der Zuckerspaltung und neue Beiträge zur Theorie der alkoholischen Gärung. Ber. 52, 1690 (1919).

Die Kolben waren stark geschüttelt, damit das Calciumsulfit sich mit der Flüssigkeit mischte. NEUBERG rät bei der Benutzung des Calciumsulfits Kohlensäuregas durch das Gärgut (oder Wasserstoff bzw. Stickstoff) zu leiten während des Schüttelns<sup>1)</sup>. Hiervon wurde in Rücksicht auf das Ablesen der Kohlensäure abgesehen, und da die Mischung ganz tadellos war, ist Gasdurchleiten überflüssig.

Die Resultate waren:

TABELLE XII.

	Abgelesene Menge CO <sub>2</sub> in ccm.		Gärgeschwindigkeit in ccm.	
	3 g CaSO <sub>3</sub> 2 aq.	—	3 g CaSO <sub>3</sub> 2 aq.	—
Nach $\frac{1}{4}$ Stunde	128	147	—	—
" " "	212	267	84	120
" " "	295	371	83	104
" " "	374	470	79	99
" " "	453	558	79	88
	.	.	.	.
	.	.	.	.
	.	.	.	.
Gesamtmenge CO <sub>2</sub>	1063	1067		

Der Kohlensäuremenge kann man also nicht anmerken, dass Acetaldehyd abgefangen worden ist. Das Sulfit wirkt verzögernd auf die Gärgeschwindigkeit. Mit der Reaktion von RIMINI<sup>2)</sup> entsteht eine dunkelblaue Verfärbung. Meiner Ansicht nach ist die Tatsache, dass die Gärung nach zu kurzer Zeit beendet ist, der Hauptgrund dass nur eine unbedeutende Menge Aldehyd abgefangen worden ist<sup>3)</sup>. Auch NEUBERG kann mit Hilfe des Calciumsulfits keine grossen Mengen Aldehyd isolieren. Die höchste Quantität wird von ihm fixiert, indem er die Gärdauer verlängert<sup>4)</sup>.

1) C. NEUBERG und M. KOBEL, Abfangverfahren. ABDERHALDEN, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden IV, 1, 606.

2) E. RIMINI, Über eine neue Farbenreaktion des Acetaldehyds. Chem. Zentr. 1898, II, 277.

3) Siehe dieser Diss. 68.

4) C. NEUBERG und E. REINFURTH, Weitere Untersuchungen über die korrelative Bildung von Acetaldehyd und Glycerin bei der Zuckerspaltung und neue Beiträge zur Theorie der alkoholischen Gärung. Ber. 52, 1690 (1919).

## § 2. DIE DIMEDONGÄRUNG.

Aus NEUBERGS Versuch <sup>1)</sup> geht hervor, dass er aus 25 g Rohrzucker mittels 50 g Hefe und 5 g Dimedon, 4.3 g fast reines Aldomedon isolieren konnte, was 618 mgr Acetaldehyd entspricht. Wahrlich kein zwingender Grund für das Auftreten von Acetaldehyd als *Zwischenprodukt* bei der alkoholischen Zuckerspaltung!

Um bedeutende Mengen Aldehyd „abzufangen“ soll man, der Sulfitgärung entsprechend, grosse Quantitäten Dimedon hinzufügen, was hinsichtlich der Giftwirkung des Dimedons auf die Hefe unmöglich ist, so dass man Dimedon nicht dem Sulfit gleichstellen kann. Bei dem nun folgenden Gärversuch ist wiederum die Kohlensäureentwicklung studiert worden. Ich fügte weniger Zucker zu als bei NEUBERGS Ansatz, weil ja eine Zuckerkonzentration über 6 % unbedingt Plasmolyse erzeugt.

### Versuch XIII.

Beschickung:

2 g Rohrzucker,  
0, bzw.  $\frac{1}{2}$ , 1,  $1\frac{1}{4}$  g Dimedon (in feinpulvriger Form),  
5 g Presshefe,  
50 ccm Wasser.  
Gärungstemperatur: 36° C.

In folgender Tabelle findet man die Ergebnisse:

TABELLE XIII.

Gärgeschwindigkeit in ccm CO<sub>2</sub>.

	— Dimedon	$\frac{1}{2}$ g Dimedon	1 g Dimedon	$1\frac{1}{4}$ g Dimedon
Nach 5 Min.	44	25	24	21
„ „ „	46	15	15	12
„ „ „	44	11	10	7

1) C. NEUBERG und E. REINFURTH, Ein neues Abfangverfahren und seine Anwendung auf die alkoholische Gärung. Biochem. Z. 106, 286 (1920).

	— Dimedon	$\frac{1}{2}$ g Dimedon	1 g Dimedon	$1\frac{1}{4}$ g Dimedon
Nach 5 Min.	43	7	7	6
" " "	40	6	6	5
	.	.	.	.
	.	.	.	.
	.	.	.	.

Die Kohlensäureentwicklung kam zum Stehen. Nachdem 5 g Presshefe hinzugefügt war:

—	30	22	13
	23	15	16
	20	12	12
	.	.	.
	.	.	.
	.	.	.

Es zeigt sich also, dass Presshefe äusserst empfindlich ist gegen Dimedon, ebenso wie die Oberhefe welche NEUBERG anwendete (für die Vergärung von 25 g Rohrzucker war ja 50 g Hefe erforderlich!).

Wenn man nun erwägt, dass man theoretisch 6.36 g Dimedon braucht um 1 g Acetaldehyd zu binden, ist es klar, dass Dimedon sich nicht zum sogenannten Abfangmittel eignet.

### III. KAPITEL.

## DIE ZWEITE VERGÄRUNGSFORM MIT ZELLFREIEN PRÄPARATEN.

---

### Die Sulfitgärung.

NEUBERG empfiehlt für Enzympräparate das neutral reagierende, unlösliche Calciumsulfit als Abfangmittel <sup>1)</sup>).

Als zellfreies Präparat ist von mir an erster Stelle Macerationssaft gewählt, bei dessen Benutzung die Homogenität des Gärmediums gesichert ist. Der Macerationssaft wurde gewonnen aus der Unterhefe der „Heinekens's Bierbrouwerij Maatschappij“ (in Pressform geliefert), indem man die durch Mull gespülte (damit grobe Verunreinigungen zurückbleiben), entbitterte, gut gewaschene und trocken gepresste Hefe erst 2 bis 3 Tage im Eisschrank aufbewahrte <sup>2)</sup>), dann in dünner Schicht 2 Tage lang bei 30° C trocknete, und schliesslich zu Pulver mahlte. Zur Herstellung des Macerationssaftes wurde nach LEBEDEW <sup>3)</sup>) ein Teil dieser Trockenhefe mit der dreifachen Menge Wasser zum Brei angerührt, und nach einem Aufenthalt von 2½ Stunden im Thermostaten bei 35° C durch einen Faltenfilter im Eisschrank filtriert.

### Versuch XIV.

Beschickung:

2 g Traubenzucker,  
0, bzw. 2 g CaSO<sub>3</sub> 2 aq.,  
25 ccm Macerationssaft.  
Gärtemperatur: 32° C.

---

1) Siehe diese Diss. 48.

2) A. P. STRUYK, Onderzoekingen over de alcoholische gisting. Diss. Delft, 1928, 31.

3) A. v. LEBEDEW, Extraction de la zymase par simple macération. Ann. inst. Pasteur 26, 8 (1912).

Es dauert eine gewisse Zeit bevor die Gärung anfängt.  
Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle notiert:

TABELLE XIV.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

	— $\text{CaSO}_3$ 2 aq.	2 g $\text{CaSO}_3$ 2 aq.
nach 5 Min.	—	—
" " "	32	34
" " "	11	16
" " "	11	9
	.	.
	.	.
	.	.
Gesamtmenge $\text{CO}_2$	453	423

Aufs neue Zufügen von Macerationssaft ergab keine weitere Vergärung. Es muss also keine bedeutende Menge Acetaldehyd abgefangen sein.

Trockenhefe und Macerationssäfte enthalten immer noch lebende Zellen. Man kann die Trocknung so weit treiben, dass die Hefe abstirbt, aber ein Teil der Zymase erhalten bleibt. Weil ich dessen gewiss sein wollte, dass ich nur mit Enzymmaterial arbeitete, behandelte ich die Hefe nach BUCHNER<sup>1)</sup>: Auf die obige Weise gereinigte und abgepresste Hefe wurde zuerst bei Zimmertemperatur, danach bei 35° C vorgetrocknet, und schliesslich 6 Stunden auf 100° C erhitzt. Nachdem sie auf Würzeagar geimpft war, wurde konstatiert dass alle Zellen getötet waren.

### Versuch XV.

Beschickung:

5 g Traubenzucker,  
0, bzw. 1½ g  $\text{CaSO}_3$  2 aq.,  
20 g BUCHNERhefe,  
50 ccm Wasser.  
Gärungstemperatur: 36° C.

1) E. BUCHNER, Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. Ber. 30, 1110 (1897).

Die Resultate waren:

TABELLE XV.

	Abgelesene Menge $\text{CO}_2$ in ccm.	
	— $\text{CaSO}_3$ 2 aq.	$1\frac{1}{2}$ g $\text{CaSO}_3$ 2 aq.
Nach 5 Stunden	387	409
	.	.
	.	.
	.	.
Gesamtmenge $\text{CO}_2$	611	618

In dem Ansatz mit Sulfit ist also kein Aldehyd abgefangen worden, und die Gärgeschwindigkeit blieb unbeeinflusst.

Ausserdem wurde ein Gärversuch durchgeführt mit  $\frac{1}{4}$  g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  statt Calciumsulfit. Nach diesem Zusatz trat keine Gärung ein, während kleine Mengen  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  schon hemmend wirken, z.B. 0.2 %.

Diese Ergebnisse entsprechen den NEUBERGSchen <sup>1)</sup>; dieser Untersucher beobachtete für Macerationssaft bei Konzentrationen über  $\frac{1}{4}$  %  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  keine Gärung. Zur Verwendung kam:

9 ccm Macerationssaft,  
 $\frac{1}{2}$  g Traubenzucker,  
 0, bzw. 1 ccm 0.2 m  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -Lösung.

Das Gemisch entwickelte nach NEUBERG 104 ccm  $\text{CO}_2$ , während die Zuckergärung nur 101.6 ccm erzeugte; in diesem Ansatz kann also kein Acetaldehyd abgefangen sein.

NEUBERG hat die Menge Acetaldehyd, welche entsteht bei Vergärung mit Trockenhefe auch quantitativ bestimmt <sup>2)</sup>. Einige seiner Versuche werden hier angeführt:

Beschickung:

a. 8.55 g Rohrzucker,  
 10 g Trockenhefe,  
 6.3 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  
 100 ccm Wasser,  
 1 ccm Toluol.

1) C. NEUBERG und E. FÄRBER, Über den Verlauf der alkoholischen Gärung bei alkalischer Reaktion. Biochem. Z. **78**, 260 (1917).

2) C. NEUBERG und E. REINFURTH, Weitere Untersuchungen über die korrelative Bildung von Acetaldehyd und Glycerin bei der Zuckerspaltung, und neue Beiträge zur Theorie der alkoholischen Gärung. Ber. **52**, 1698 (1919).

Die Acetaldehydausbeute betrug *nach 3 Monaten* 0.1154 g.

- b. 8.55 g Rohrzucker,  
10 g Trockenhefe,  
6.3 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  
100 ccm Wasser.

Nach 8 Tage wurde 10 g Trockenhefe hinzugefügt, nach 16 Tage noch einmal 5 g. Nach 40 Tagen erhielt NEUBERG 0.2970 g Acetaldehyd.

c. wie b, aber ausserdem 2 ccm Toluol. Der Aldehydgehalt ergab sich zu 0.0684 g.

- d. 9.5 g Rohrzucker,  
25 g frisch bereitetes, lufttrockenes Calciumsulfit,  
10 g Trockenhefe,  
100 ccm Wasser.

Nach 8 Tagen wurde 5 g Trockenhefe hinzugefügt, nach 28 Tagen war die Acetaldehydausbeute 0.4652 g.

e. Hier gelangten die gleichen Mengenverhältnisse wie in d zur Anwendung, jedoch unter Zugabe von 2 ccm Toluol. Ausbeute: 0.2158 g Acetaldehyd.

Die Möglichkeit Acetaldehyd abzufangen ist, meiner Ansicht nach, bei Benutzung von zellfreien Präparaten sicher ebenso gross als wenn man lebende Hefe anwendet. NEUBERG erwähnt nicht in welcher Weise er sein Material gewonnen hat; vermutlich enthielt seine Trockenhefe wachstumsfähige Zellen, abhängig von der Temperatur der Trocknung. Hierauf wird wohl der Unterschied der Ergebnisse von b. und c, bzw. d und e zurückzuführen sein.

*Die mitgeteilten Daten lehren, dass die Sulfitgärung gebunden ist an die lebende Zelle.*

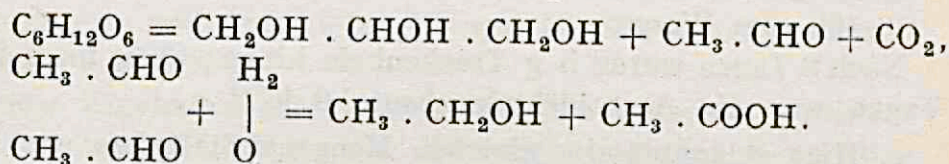
Da allgemein bekannt ist, dass Acetaldehyd auftritt bei Autolyse der Hefe <sup>1)</sup>, und neben diesen NEUBERGSchen Versuchen weder Blankoversuche (d.h. Ansätze unter genau denselben Bedingungen aber ohne Sulfit) gemacht worden sind, noch die Anwesenheit von etwaigen lebenden Zellen kontrolliert worden ist, muss nach meiner Ansicht dem Auftreten dieser geringen Quanten Acetaldehyd keinen Wert beigelegt werden.

1) C. NEUBERG und J. KERB, Über Zuckerfreie Hefegärungen. Biochem. Z. **58**, 158 (1913); **43**, 494 (1912); Zur Frage der Bildung von Acetaldehyd bei Hefegärungen. Ber. **47**, 2730 (1914).

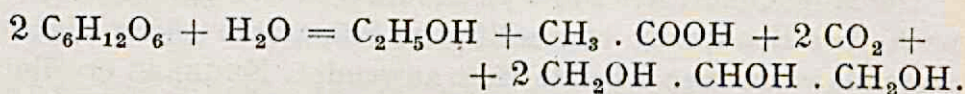
#### IV. KAPITEL.

### DIE DRITTE VERGÄRUNGSFORM.

NEUBERG denkt sich diese Form der Zuckerspaltung so, dass zunächst Acetaldehyd, Glycerin und Kohlensäure in aequimolekularen Mengen entstehen; dass jedoch durch das Auftreten der CANNIZAROSchen Reaktion jedes Molekül Essigsäure sich aus 2 Molekülen Acetaldehyd gebildet hat. Somit nehmen die Gärungsgleichungen folgende Form an:



Die Gärung in alkalischer Lösung soll also nach folgender Endformulierung verlaufen:



Diese Gleichung ist in der Praxis nicht realisierbar sowie bei der Sulfitgärung, wo die Ausbeute an Glycerin mehr als 70 % der theoretisch möglichen Menge erreicht. Um geringe Mengen Essigsäure zu isolieren, muss NEUBERG zur Anwendung von abnormal hohen Salz- und Zuckerkonzentrationen schreiten <sup>2)</sup> (10 % Zucker, 12.6 %  $\text{NaHCO}_3$ , bzw. 1.4 %  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 17.4%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 14.2 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  usw.).

Damit man sich eine Vorstellung von den Ergebnissen der NEUBERGSchen Versuche machen kann, folgen hier einige Beispiele <sup>3)</sup>:

1) C. NEUBERG und E. FÄRBER, Über den Verlauf der alkoholischen Gärung bei alkalischer Reaktion. *Biochem. Z.* **78**, 238 (1917); C. NEUBERG und J. HIRSCH, *Biochem. Z.* **96**, 175 (1919); Die dritte Vergärungsform des Zuckers. *Biochem. Z.* **100**, 304 (1919).

2) C. NEUBERG und J. HIRSCH, *Biochem. Z.* **100**, 317 (1919).

3) C. NEUBERG und J. HIRSCH, Die dritte Vergärungsform des Zuckers. *Biochem. Z.* **100**, 308 (1919).

## a. Beschickung:

10 g Hexose,

10 g Hefe M,

1.4 g  $K_2CO_3$ ,

Wasser zu einem Volumen von 100 ccm.

Dieser Versuch ergab:

an Äthylalkohol 4.17, bzw. 4.16 g,

an Glycerin 0.67, bzw. 0.56 g,

an Essigsäure 0.23, bzw. 0.18 g.

Aus 10 g Hexose entstand also 230 mg Essigsäure!

(In diesem Versuch war eine Konzentration an  $K_2CO_3$  gewählt wobei die Gärung noch gerade zu Ende kam.)Für  $NaHCO_3$  konnte das höchste Quantum an Essigsäure isoliert werden bei einer Konzentration von 25.2 bis 12.6 % <sup>1)</sup>:

## b. Beschickung:

9 g Hexose,

9 g Hefe M,

12.6 g  $NaHCO_3$ ,

Wasser zu einem Volumen von 100 ccm.

Die Ausbeute an Äthylalkohol betrug: 2.77 g,

an Glycerin 1.23 g,

an Essigsäure 0.5 g.

Es nimmt mich wunder, dass die Hefe in so bedrängten Verhältnissen überhaupt noch gären konnte; dass neben den normalen Endprodukte abnormale auftraten, darüber wird keiner staunen.

Ich entschloss mich die alkoholische Vergärung zu studieren ohne der Hefe zu schaden.

0.5 %  $Na_2CO_3$  war eine Konzentration wobei die normale Gärgeschwindigkeit erreicht wurde.

---

1) C. NEUBERG und J. HIRSCH, Über den Verlauf der alkoholischen Gärung in alkalischer Lösung. Biochem. Z. 96, 196 (1919).

**Versuch XVI.**

Beschickung:

2, bzw. 3, 4, 5 g Rohrzucker,

500 mg  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,

5 g Presshefe,

100 ccm Wasser.

Gärtemperatur:  $36^\circ \text{C}$ .

Die Resultate waren:

TABELLE XVI.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

	2 g Saccharose	3 g Saccharose	4 g Saccharose	5 g Saccharose
Nach 18 $\times$ 5 Min.	0	0	0	0
Nach 5 Min.	0	0	20	40
" " "	0	13	40	40
" " "	0	40	43	41
" " "	21	41	42	42
" " "	40	42	42	41
" " "	40	40	41	40
" " "	40	41	43	41
" " "	38	39	41	41
" " "	36	40	40	39
" " "	31	38	39	40
" " "	26	38	40	40
" " "	18	33	41	43
" " "	12	29	38	39
" " "	.	.	.	.
" " "	.	.	.	.
" " "	.	.	.	.

Wendet man statt Carbonat Bicarbonat an:

**Versuch XVII.**

Beschickung:

3, bzw. 5, 6 g Rohrzucker,

700 mg  $\text{NaHCO}_3$ ,

5 g Presshefe,

100 ccm Wasser.

Gärtemperatur:  $36^\circ \text{C}$ .

TABELLE XVII.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

	3 g Saccharose	5 g Saccharose	6 g Saccharose
Nach 5 Min.	—	—	—
" " "	31	30	29
" " "	41	38	37
" " "	43	43	42
" " "	43	44	43
" " "	43	43	44
" " "	42	44	44
	.	.	.
	.	.	.
	.	.	.

**Versuch XVIII.**

Beschickung:

6 g Rohrzucker,

4.2 g  $\text{NaHCO}_3$ ,

5 g Presshefe,

100 ccm Wasser.

Gärtemperatur:  $36^\circ \text{C}$ .

Nachstehende Tabelle zeigt die Ergebnisse:

TABELLE XVIII.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

Nach 5 Min.	—
" " "	12
" " "	10
" " "	12
" " "	16
" " "	21
" " "	26
" " "	31
" " "	34
" " "	37

Die Geschwindigkeit bleibt noch  $9 \times 5$  Min. dieselbe, nimmt dann allmählich ab.

Besehen wir Tabelle XVI, so zeigt sich dass im Anfang der Vergärung keine Kohlensäure entwickelt, also kein Zucker vergoren wird. Es bleibt Kohlensäure im Gärgut zurück weil sich Bicarbonat bildet; hierfür kommen allerdings noch nicht 50 ccm in Betracht. Der Zucker soll nach meiner Ansicht in irgend einer Form festgehalten werden, während das Carbonat langsam hineindiffundiert.

NEUBERG <sup>1)</sup> beobachtete, dass während der ersten Stunden der Vergärung der Acetaldehydgehalt in immer steigendem Masse zunimmt; später verschwindet dieser Aldehyd und wird zu Essigsäure und Äthylalkohol.

Hier folgen einige Beispiele eigener Untersuchungen.

### Versuch XIX.

Beschickung:

3 g Rohrzucker,  
0.5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  
5 g Presshefe,  
100 ccm Wasser.  
Gärtemperatur: 36° C.

Nach jeder Viertelstunde wurde 3 ccm des Gärguts mit der Reaktion von RIMINI auf die Anwesenheit von Acetaldehyd untersucht. Erst als Kohlensäureentwicklung eintrat entstand eine äusserst schwache positive Reaktion: eine Spur Acetaldehyd war also da. Am Ende der Vergärung zeigte sich, nach dem Ansäuern und Destillieren des Gärguts, dass keine flüchtigen Verbindungen anwesend waren. Dazu war meiner Ansicht nach der Hefe noch nicht genügend geschadet worden.

Eine Konzentration von 4.2 %  $\text{NaHCO}_3$  hat schon einen schädigenden Einfluss auf die Hefe, so dass die normale Geschwindigkeit nicht mehr erreicht werden kann (siehe Tabelle XVIII).

Wendet man statt lebender Hefe BUCHNERhefe an:

---

1) C. NEUBERG und J. HIRSCH, Die dritte Vergärungsform des Zuckers. Biochem. Z. **100**, 316 (1919).

**Versuch XX.**

Beschickung:

5 g Rohrzucker,  
 0, bezw. 300, 400, 500 mg  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  
 20 g BUCHNERhefe,  
 50 ccm Wasser.  
 Gärtemperatur:  $36^\circ \text{C}$ .

dann bekommt man folgende Resultate:

TABELLE XX.

Gärgeschwindigkeit in ccm  $\text{CO}_2$ .

	— $\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.3 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.4 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.5 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$
Nach 5 Min.	—	—	—	—
" " "	0	7	10	10
" " "	4	18	25	18
" " "	9	25	30	21
" " "	13	47	36	31
" " "	17	46	32	30
" " "	23	42	29	25
" " "	21	34	24	20
	.	.	.	.
	.	.	.	.
	.	.	.	.
Gesamtmenge $\text{CO}_2$ :	1196	1342	1403	1353

Die Gärungsgeschwindigkeit ebenso wie die Gesamtmenge Kohlensäure hat zugenommen. Nach dem Ansäuern und Destillieren des Gärguts liessen sich keine flüchtigen Säuren nachweisen. Weshalb die Gärgeschwindigkeit und die Kohlensäureausbeute gesteigert sind, bleibt eine offene Frage. Die einzige Folgerung, welche aus diesem Versuch zu ziehen ist, ist diese: *dass Resultate von Versuchen mit zellfreiem Material nicht für die lebendige Zelle selbe gelten.*

Es ist also höchstwahrscheinlich, dass auch die dritte Ver-

gärungsform die Folge einer Zellschädigung ist; zunächst tritt ja Acetaldehyd auf, und später entsteht an seiner Statt Essigsäure.

Gewiss ist, dass das Auftreten der dritten Vergärungsart nicht als Beweis für die Richtigkeit der NEUBERGSchen Theorie gelten darf. Nach dieser Theorie sollte, *unter Einfluss von einem geringeren Quantum Alkali als Neuberg benutzte, ein grösseres Quantum Essigsäure entstehen.*

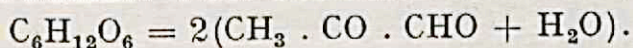
---

## V. KAPITEL.

### DIE VIERTE UND FÜNFTE VERGÄRUNGSFORM.

Wie ich schon im II. Teil I. Kap. erwähnte, beruht das Auftreten dieser Vergärungsformen auf der Möglichkeit, die Cozymasefraktion der Hefe zu lähmen oder vernichten, so dass nur die Wirkung der Apozymase restiert.

#### § 1. DIE FÜNFTE VERGÄRUNGSFORM ODER DAS ENTSTEHEN VON METHYLGLYOXAL.



Es soll NEUBERG und KOBEL gelungen sein, das Auftreten des Methylglyoxals als Zwischenprodukt bei der alkoholischen Zuckergärung zu beweisen, indem sie 85.4 % der theoretischen Menge an Methylglyoxal isolierten <sup>1)</sup>.

Für das Aufstellen einer Bilanz wendeten sie als Enzymmaterial ein Extrakt aus plasmolysierter Hefe an. Dieser Versuch wurde von NEUBERG und KOBEL folgendermassen durchgeführt <sup>2)</sup>:

Zusammenstellung der Ansätze:

1. 200 ccm Plasmolysensaft,  
400 ccm 4.73 % hexose-di-phosphorsaures Magnesium,  
6 ccm Toluol.
2. 200 ccm Plasmolysensaft,  
400 ccm Wasser,  
6 ccm Toluol.
3. 50 ccm Plasmolysensaft,  
100 ccm 0.15 % Methylglyoxallösung,  
1.5 ccm Toluol.

1) C. NEUBERG und M. KOBEL, Die desmolytische Bildung von Methylglyoxal durch Hefenenzym. Biochem. Z. **203**, 463 (1928); Weiteres über die Vorgänge bei der desmolytischen Bildung von Methylglyoxal durch Hefe. Biochem. Z. **210**, 466 (1929); Weiteres über die Bildung von Methylglyoxal sowie Brenztraubensäure durch Hefen unter der Wirkung verschiedener plasmolytischen Stoffe. Biochem. Z. **229**, 255 (1930).

2) C. NEUBERG und M. KOBEL, Biochem. Z. **210**, 475 (1929).

4. 50 ccm Wasser,  
 100 ccm 0.15 % Methylglyoxallösung,  
 1.5 ccm Toluol.

Versuchsdauer 1 Tag; Temperatur: 37° C.

Zunächst nimmt NEUBERG an, dass die beim Zuckerabbau auftretenden labilen Formen von Methylglyoxal durch 2,4-Di-nitro-phenylhydrazin als normales Hydrazon gefällt werden.

Die Resultate seiner Ansätze waren:

2. ergab mit 2,4-Di-nitro-phenylhydrazin keine Fällung.  
 500 ccm von 1. enthielten 0.0533 g Methylglyoxal-hydrat.  
 Aus 3. und 4. ging hervor,  
 dass in 500 ccm des Haupt-  
 versuchs

0.1189 g Methylglyoxal-hydrat  
 durch Dismutation  
 verschwunden war.

---

In 500 ccm sind also 0.1722 g Methylglyoxal-hydrat  
 gebunden worden.

Wie man sieht wird eine Korrektur angewandt, welche  $2 \times$  die isolierte Menge beträgt.

Wie haben NEUBERG und KOBEL diese Korrektur gefunden?

Indem sie die Menge Methylglyoxal, die in einer 0.1 % igen Lösung dismutiert wird, ermittelten. Die Gesamtmenge Methylglyoxal, nachdem sie zu der Korrektur addiert ist, veranlasst eine Konzentration von nur 0.03 %. In Ansatz 3. ist der Methylglyoxal auf einmal hinzugefügt, während im Hauptversuch  $\frac{1}{3}$  dieser Menge allmählich entstehen würde.

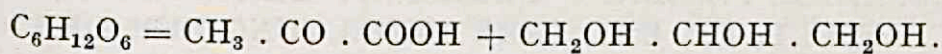
Dass man aus derartigen Bilanzen keine Schlüsse ziehen darf versteht sich von selbst.

Und alles dies noch abgesehen von der Tatsache, dass fertig zugesetzter Methylglyoxal mittels Hefe nicht vergoren wird!

Aus obenerwähnten Versuchen darf man nur folgern, dass unter Einfluss plasmolytischer und giftiger Stoffe aus hexose-di-phosphorsaures Magnesium Verbindungen entstehen, welche von 2,4-Di-nitro-phenylhydrazin als Methylglyoxal-bis-di-nitro-phenylhydrazon gefällt werden. Das besagt aber noch

nichts für das Auftreten von Methyl-glyoxal *als Zwischenprodukt* bei der alkoholischen Zuckergärung <sup>1)</sup>).

## § 2. DIE VIERTE VERGÄRUNGSFORM, ODER DAS ENTSTEHEN VON BRENZTRAUBENSÄURE.



NEUBERG und KOBEL <sup>2)</sup> haben dargetan, dass aus Magnesiumhexose-di-phosphat mittels Trockenhefe Brenztraubensäure isoliert werden kann; in geringer Menge findet man diese, wenn man 10 %-ige Glucoselösungen (eine Konzentration welche zweifellos Plasmolyse erzeugt), unter Zugabe von 1.5 bis 5 % des Flüssigkeitsgewichts an frischer Presshefe und 0.125 bis 0.75 % Magnesiumphosphat, vergären lässt <sup>3)</sup>.

Auch diese Tatsachen beweisen nicht das Auftreten der Brenztraubensäure *als Zwischenglied* bei der alkoholischen Zuckerspaltung <sup>4)</sup>.

1) Siehe diese Diss. 67.

2) C. NEUBERG und M. KOBEL, Über den Verlauf der Brenztraubensäure-bildung bei der Hefen-gärung. Biochem. Z. **219**, 490 (1930).

3) C. NEUBERG und M. KOBEL, Die Zerlegung von nicht phosphoryliertem Zucker durch Hefe unter Bildung von Glycerin und Brenztraubensäure. Biochem. Z. **229**, 446 (1930).

4) l. c. 1).

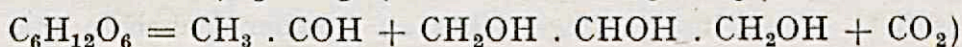
## VI. KAPITEL.

### ZUSAMMENFASSENDE ÜBERSICHT DER ERLANGTEN RESULTATE, UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DEN HEUTIGEN STAND DES GÄRUNGSPROBLEMS.

---

Aus der vorhergehenden Untersuchung ergibt sich:

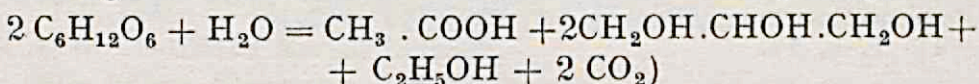
I. *Die Sulfitgärung* (oder zweite Vergärungsform:



*steht nicht im Zusammenhang mit der Zuckergärung, denn es hat sich als möglich erwiesen erstgenannten Prozess teilweise vom letzteren zu trennen.*

II. *Die Sulfitgärung tritt infolge der schädlichen Wirkung des Sulfits auf.*

III. *Die Sulfit- und alkalische Gärung* (alkoholische Gärung bei alkalischer Reaktion oder dritte Vergärungsform:



*sind nur an die lebende Zelle gebunden, im Gegensatz zu der Zuckergärung, welche auch zellfrei verläuft.*

IV. *Die alkalische Gärung soll als eine Folge der zweiten Vergärungsform betrachtet werden.*

V. *Es ist unwahrscheinlich dass Acetaldehyd als Zwischenprodukt bei der alkoholischen Zuckergärung auftritt. In diesem Fall sollte dieser bei der zellfreien Gärung m.E. in grossen Mengen abgefangen werden müssen.*

Bei der Abfassung der verschiedenen Gärungsschemata, und auch bei der Studierung des Chemismus biochemischer Prozesse, machen die heutigen Untersucher, nach meiner Ansicht, einen grossen Fehler; und zwar, dass sie vergessen, dass *Lebensprozesse* nicht verglichen werden können mit Reaktionen, welche im Reagenzglas vor sich gehen.

In der Natur strebt jeder Organismus danach sich zu erhalten, und ungünstigen Umständen die Stirn zu bieten.

Ein Organismus ist gegen verschiedene Chemikalien äusserst empfindlich, so dass geringe Quantitäten schon in seiner Assimilation und Dissimilation eine völlige Umänderung zur Folge haben können. Tritt durch Veränderung des Gärmediums (z.B. Hinzufügung irgend eines Stoffes) ein Gärprodukt, das beim normalen Prozesse nicht gebildet wird in den Vordergrund, so ist dies keinesfalls eine Anweisung, dass dieses Produkt auch am normalen Prozesse teilnimmt <sup>1)</sup>.

E. WERTHEIMER <sup>2)</sup> hat dargetan, dass wenn man gärfähige Zucker einer Hefesuspension zufügt, diese verschwinden ohne vorher Gärung hervorgerufen zu haben. Die Zuckerbindung hängt mit der Bildung von hochmolekularen Polysacchariden zusammen. Nach WERTHEIMER wird kein Glycogen, aber polymerisiertes Glycogen, oder Glycogen, das an irgend einen Körper chemisch oder physisch gebunden ist, erzeugt.

Auch schon früher hat GRÜSS <sup>3)</sup> die Hypothese aufgestellt, dass in der Hefe der Zucker zunächst zum Glycogen wird.

Ich stelle mir nun vor, dass bei der normalen Zuckergärung der Zucker ganz oder teilweise in Polysaccharid verwandelt wird. Wenn nötig dient letzteres zum Teil zur Ergänzung des Reservestoffs, während das Übermass vergoren wird, und dem Organismus Energie liefert.

Nehmen wir nun den Fall der Sulfitgärung, so bildet die Hefe unter Einfluss des schädlichen Sulfits aus dem Polysaccharid Acetaldehyd, Glycerin und Kohlensäure (zweite Vergärungsform). Vielleicht werden diese Produkte wohl direkt aus dem Zucker erzeugt. Dies dauert solange, bis das Sulfit gebunden ist, und die Gärung normal verlaufen kann. (Bringt man Hefe mit einer Sulfitlösung zusammen ohne Zucker, dann entsteht jedenfalls auch Acetaldehyd aus ihrem Reservekohlehydrat.)

Wird der Zucker nur teilweise in Polysaccharid verwandelt, so könnte vielleicht ein kleiner Teil direkt vergoren werden.

---

1) Vergl. das Isolieren von Acetaldehyd, Methylglyoxal und Brenztraubensäure.

2) E. WERTHEIMER, Zuckerbindung und anschliessende synthetische Vorgänge durch Hefezellen. *Fermentf.* **11**, 37 (1930).

3) GRÜSS, *Z. f. d. ges. Brauw.* **27**, 689 (1904).

Indem man Sulfit zufügt, sollte dieser Teil dann jedenfalls an der Gärung verhindert werden.

Es ist nichts darüber bekannt ob Gärungen direkt oder indirekt statthaben.

Bei Anwendung von Calciumsulfit als Abfangmittel kann dieses Sulfit fortwährend in der Zelle neutralisiert werden (durch die schwache Konzentration infolge der geringen Löslichkeit), so dass hier neben der Sulfitgärung die Zuckergärung verläuft. Dauert eine solche Gärung nur lange genug, dann kann noch eine bedeutende Menge Aldehyd entstehen. Dies war nicht der Fall in Versuch XII, wo die Gärungsgeschwindigkeit viel zu gross war <sup>1)</sup>.

Für die alkalische Gärung gilt dasselbe Prinzip: wird soviel Alkali hinzugefügt, dass dieses der Hefe schadet, so entsteht die zweite Vergärungsform; später wird der Acetaldehyd zu Essigsäure und Äthylalkohol verarbeitet. Meiner Ansicht nach hängt das Auftreten geringerer oder grösserer Essigsäuremengen von dem Grad der Schädigung ab.

Es dürfte klar sein, dass die von NEUBERG isolierten Mengen Acetaldehyd, Glycerin u.s.w. von obenerwähnter Betrachtung völlig gedeckt werden.

Aus der beschriebenen Vorstellung folgt, dass Acetaldehyd am leichtesten aus denjenigen Stoffen entstehen wird, deren Hefe am besten anaerob wächst; an erster Stelle kommen hierfür die Zuckerarten in Betracht. Dioxyaceton, ein schlechter Wachstumsnährstoff für Schiz. Pombe ergab eine, nicht zu Ende zu führende Sulfitgärung, und wie wir schon sahen, konnte bei der Äpfelsäurevergärung kein Acetaldehyd abgefangen werden<sup>1)</sup>, was der Tatsache entspricht, dass bei Verwendung von Äpfelsäure als Nährstoff kein wahrnehmbares Wachstum von Schiz. Pombe eintritt.

(Die Zuwachsversuche wurden folgendermassen durchgeführt: Zu Leitungswasser-agar, der 10% Hefe-agar und  $\frac{1}{2}$  % der verschiedenen Zucker, bzw. Dioxyaceton, l-Äpfelsäure enthielt, fügte ich 1 ccm einer Suspension von Schiz. Pombe. Ausserdem wandte ich Äpfelsäurekonzentrationen von 0.1 und 0.05 % an. Die PETRI-schalen wurden in einem Exsiccator

---

1) Siehe diese Diss. 49.

gefüllt mit Kohlensäure in einen Thermostaten bei ungefähr 30° C. gestellt; nach einigen Tagen war etwaige Zellenvermehrung der Schiz.Pombe wahrnehmbar.)

Wie man sich den Chemismus der Zuckergärung nun denken soll, bleibt eine offene Frage; es besteht nicht der mindeste Grund dafür anzunehmen, dass dieser Prozess stufenweise verläuft. Die Stütze der Gärungstheorien ist weggefallen: *der von Neuberg bei der alkoholischen Zuckergärung isolierte Acetaldehyd entsteht unter Einfluss des schädlichen Sulfits.*

Es ist unwahrscheinlich, dass der Acetaldehyd bei der alkoholischen Gärung als Zwischenglied eine Rolle spielt, weil es bei der zellfreien Gärung nicht abgefangen werden kann.

Man kann gerade so gut behaupten, dass das Zuckermolekül direkt zerfällt in Kohlensäure und Äthylalkohol.

Von den Enzymen, welche die Sulfit- und alkalische Gärung bewirken, lässt sich auch nichts Bestimmtes angeben. Es ist möglich, dass es vereinzelte Enzyme sind, aber unmöglich scheint es nicht, dass sie einen Teil der Zymase bilden.

Bei der Herstellung von zellfreien Präparaten geht nur wenig des Gesamtfermentgehaltes in Lösung. Der grösste Teil der Zymase kann in dieser Weise nicht isoliert werden. BUCHNER nimmt an, dass sie frei in der Zelle vorkommt, während andre die Meinung vertreten, dass sie an das Protoplasma gebunden ist. Hierzwischen stehen andre Auffassungen; u.a. denken besonders EULER, HAYDUCK und HAEHN, dass der Hauptteil der Zymase protoplasmagebunden, der Rest frei in der Zelle anwesend ist. Beim Trocknen und durch Gifte geht der gebundene Teil zugrunde; der müsste dann unter Einfluss des Sulfits bzw. des Alkalis den Reservestoff, oder das ihm vorangehende Produkt abbauen zu Acetaldehyd, Glycerin und Kohlensäure.

Für diese Behauptung lässt sich absolut kein Beweis anführen, so dass man mit gleichem Recht annehmen kann, dass sich in der Hefezelle zwei specielle Enzyme befinden, welche die Sulfit- und alkalische Gärung veranlassen.

Das Auftreten des Acetaldehyds ist meiner Ansicht nach eine Einleitung der Autolyse.

Man muss den NEUBERGSchen Experimenten, ebenso wie dem genialen Gedanken der seinem Schema zugrunde liegt,

Bewunderung zollen. Die mitgeteilten Versuche beweisen aber, dass seine Schlüsse unhaltbar sind.

Generalisieren ist grundfalsch; so darf man die Resultate, welche für die alkoholische Zuckergärung gefunden sind, nicht auf andre Gärungsprozesse, z.B. bakterielle, oder überhaupt auf damit scheinbar analoge Prozesse der lebenden Natur, anwenden.

In Zukunft wird eine ganz neue Methodik aufgebaut werden müssen, damit man mit Bestimmtheit sagen kann, ob bei Lebensprozessen Zwischenprodukte auftreten, und damit man für ihre etwaige Existenz den Beweis führen kann.

Heute lässt sich nur konstatieren, dass was die Microbiologie betrifft, die jetzigen Gärungsschemata als zweifelhaft betrachtet werden müssen. Dies gilt sowohl für die Schemata, abgefasst von denjenigen Untersuchern, welche die Methode von NEUBERG anwenden, als für diejenigen, welche den Acetaldehyd wie etwas Selbstverständliches in ihrem Schema benutzen.

---

# I N H A L T.

	Seite
Einleitung .....	1

## I. TEIL.

### BEITRAG ZUR KENNTNIS DER ALKOHOLISCHEN VERGÄRUNG DER ÄPFELSÄURE DURCH SCHIZO- SACCHAROMYCES POMBE.

Kap. I. Die alkoholische Vergärung der Äpfelsäure durch Schizosaccharomyces Pombe .....	5
§ 1. Ältere Untersuchung .....	5
§ 2. Eigne Untersuchung .....	6
§ 3. Das Resultat .....	10
Kap. II. Versuche mit Press-saft .....	11
Kap. III. Die Vergärung der Äpfelsäure verglichen mit der der Brenztraubensäure .....	12
Kap. IV. Untersuchung nach der Bildung des Acetalde- hyds als Zwischenprodukt .....	18
§ 1. Das Prinzip der verschiedenen Methoden .....	18
§ 2. Das Abfangen des Acetaldehyds mit Natrium- sulfid und Dimedon bei der Äpfelsäurevergärung .....	20

## II. TEIL.

### DIE ALKOHOLISCHE ZUCKERGÄRUNG.

Kap. I. Die bestehenden Auffassungen über den Chemismus der alkoholischen Zuckergärung .....	25
Kap. II. Die zweite Vergärungsform angewandt auf Gärun- gen mit lebender Hefe .....	31
§ 1. Die Sulfidgärung .....	31
§ 2. Die Dimedongärung .....	50

	Seite
Kap. III. Die zweite Vergärungsform mit zellfreien Präparaten .....	52
Kap. IV. Die dritte Vergärungsform .....	56
Kap. V. Die vierte und fünfte Vergärungsform .....	63
Kap. VI. Zusammenfassende Übersicht der erlangten Resultate, und ihre Bedeutung für den heutigen Stand des Gärungsproblems .....	66

# STELLINGEN.

---

## I.

Acetaldehyde is geen tusschenproduct bij de alcoholische suikergisting.

## II.

Het optreden der 2<sup>de</sup>, 3<sup>de</sup>, 4<sup>de</sup> en 5<sup>de</sup> gistingsvorm kan niet als bewijs voor de juistheid van NEUBERG's theorie gelden.

## III.

Het volgens de meest gebruikelijke methode bereide diacetyl bevat belangrijke hoeveelheden onzuiverheden.

O. DIELS, E. STEPHAN, Ber. **40**, 4337 (1907).

## IV.

De verklaring van BANCROFT en DAVIS voor het feit, dat boorzuur na toevoeging van glycerine als een sterk zuur te titreeren is, is aannemelijk.

W. D. BANCROFT, H. L. DAVIS, J. Phys. Chem, **34**, 2479 (1930).

## V.

Het niet aanwezig zijn van mozaiekvirus in de zaden der tabak mag geenszins verklaard worden door het niet diffundeeren van het contagium in de kiem.

H. M. QUANJER, Mededeelingen van de Landbouwhoogeschool **17**, 49 (1920).

## VI.

De conclusie, dat de gisting der coli-typhus-bacteriën geen enzymatisch proces is, gebaseerd op het feit, dat glucose door het gistperssap der colibacteriën niet vergist wordt, is onjuist.

A. J. LE FÈVRE, Proefschr. Utrecht 1924.

## VII.

De kalktoestand is niet de oorzaak van de veenkoloniale haverziekte en de Hooghalensche ziekte.

## VIII.

In het belang der volksgezondheid en ter rationalisatie der gezondheidszorg moet, naast de medische, ook de oeconomische waarde der geneesmiddelen en spécialité's vastgesteld en aan de artsen bekend gemaakt worden.

## IX.

De apotheker kan nooit verantwoordelijk zijn voor de samenstelling van verpakte geneesmiddelen.

## X.

Jongelui, die niet voldoende capaciteiten bezitten om het onderwijs aan de Universiteit te volgen, moeten ook van studie aan de Landbouw-, Technische en Handelshoogeschool afzien.

---









