

# **Beiträge zur Biochemie der Mikroorganismen.**

Von

**Hartwig Franzen.**

**V. Mitteilung.<sup>1)</sup>**

**Über die Vergärung und Bildung der Ameisensäure durch Hefen.**

Von

**Hartwig Franzen und O. Steppuhn.**

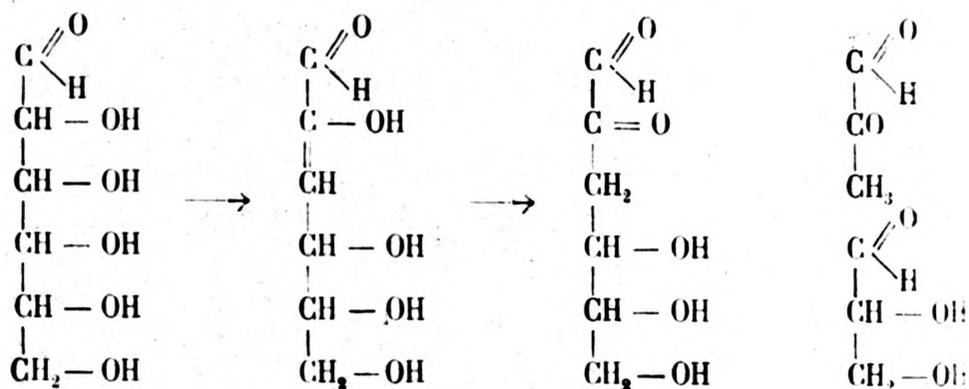
(Mitteilung aus dem chemischen Institut der Universität Heidelberg.)  
(Der Redaktion zugegangen am 8. Februar 1912.)

Durch die glänzenden Untersuchungen Eduard Buchners und seiner Mitarbeiter, speziell Jakob Meisenheimers, ist neuer Fluß in die Untersuchung der Gärungserscheinungen, besonders der alkoholischen Gärung, gekommen. Viele Punkte bedürfen aber noch der Aufklärung und aus diesem Grunde haben wir das Verhalten von Hefe und von Hefepreßsaft gegenüber Ameisensäure, welche ja eines der hypothetischen Zwischenprodukte der alkoholischen Gärung ist, untersucht. Ein anschauliches Bild von dem Verlauf des Zuckerzerfalls bei der alkoholischen Gärung machte sich zuerst Adolf Baeyer<sup>2)</sup> in einer klassischen Abhandlung «Über die Wasserentziehung und ihre Bedeutung für das Pflanzenleben und die Gärung». Baeyer nimmt an, daß die Glukosekette zunächst in der Weise weiter verändert wird, daß unter Abspaltung und Wiederanlagerung von Wasser eine Verschiebung der Hydroxylgruppen nach der Mitte der Kette zu eintritt, daß also die Mitte der Kette oxydiert, die Enden dagegen reduziert werden. Es bildet sich so das äußere Anhydrid der Milchsäure,

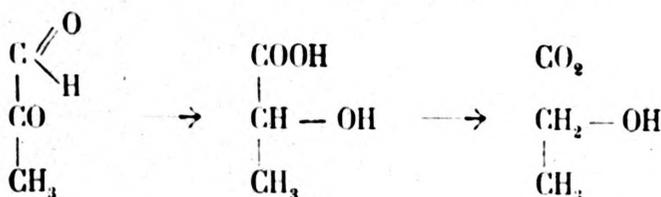
<sup>1)</sup> IV. Mitteilung: Diese Zeitschrift, Bd. 70 (1910), S. 19.

<sup>2)</sup> Ber., Bd. 3 (1870), S. 63.

welches dann in zwei Moleküle Äthylalkohol und zwei Moleküle Kohlendioxyd zerfallen soll. Unter Beibehaltung des Hauptgedankens von Adolf Baeyer gaben dann Buchner und Meisenheimer<sup>1)</sup> dem Zuckerzerfall eine etwas andere Formulierung. Sie nehmen an, daß unter Abspaltung und Wiederanlagerung von Wasser zunächst eine Dioxyketonsäure entsteht, welche dann weiterhin in zwei Moleküle Milchsäure zerfällt. Die Milchsäure geht dann unter Abspaltung von Kohlendioxyd in Äthylalkohol über. Etwas später stellte dann Wohl,<sup>2)</sup> gestützt auf Erfahrungen, welche sich beim Übergang von Weinsäure in Oxalessigsäure ergeben hatte, wieder ein anderes Spaltungsschema des Zuckerzerfalls auf. Er nimmt auch zunächst die Abspaltung von einem Molekül Wasser aus der Glukose an. Die hierbei gebildete ungesättigte Verbindung geht dann in ein Keton über (Enol-Ketoverschiebung) und dieses unterliegt dann der hydrolytischen Spaltung in ein Molekül Methylglyoxal und ein Molekül Glycerinaldehyd



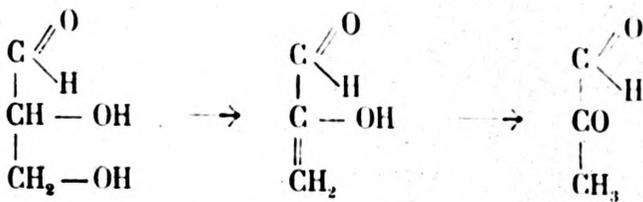
Das Methylglyoxal lagert sich weiterhin in Milchsäure um und diese zerfällt in Alkohol und Kohlendioxyd



Der Glycerinaldehyd geht in Methylglyoxal über und dieselbe unterliegt der eben formulierten Umwandlung

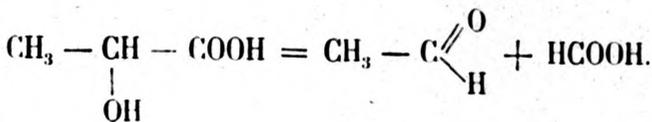
<sup>1)</sup> Ber., Bd. 37, I (1904), S. 422.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 5, S. 45.

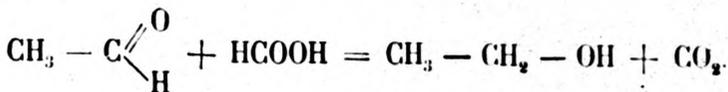


Auf die Tatsachen, welche diese Theorie des Zuckerzerfalls stützen, kann hier nicht näher eingegangen werden.

Schade<sup>1)</sup> hat dann die Wohlsche Zerfallstheorie noch etwas weiter ausgebaut, indem er annahm, daß auch der letzte Vorgang, der Zerfall der Milchsäure in Alkohol und Kohlendioxyd, sich wieder aus Teilvorgängen zusammensetzt. Schade glaubt, gestützt auf die Tatsache, daß  $\alpha$ -Oxysäuren sich verhältnismäßig leicht in einen Aldehyd und Ameisensäure spalten lassen, daß die Milchsäure zunächst in Acetaldehyd und Ameisensäure zerfällt



Weiterhin soll dann die Ameisensäure den Acetaldehyd zu Äthylalkohol reduzieren und dabei selbst in Kohlendioxyd übergehen



Es ist Schade auch tatsächlich gelungen, den zweiten Teil des Vorganges, die Reduktion von Acetaldehyd durch Ameisensäure mit Hilfe von Rhodium als Katalysator, durchzuführen. Diese Annahme ist auch von Felix Ehrlich<sup>2)</sup> gemacht worden.

Im Hinblick auf diese Schadesche Erweiterung der Wohlschen Gärungstheorie haben wir es unternommen, zu versuchen, ob Ameisensäure durch Hefen vergoren werden kann. Man muß ja a priori annehmen, daß die Hefe, wenn sie den Gesamtvorgang veranlaßt, auch die Teilvorgänge aus-

<sup>1)</sup> Zeitschrift f. physikal. Chemie, Bd. 57, S. 1. — Biochem. Zeitschrift, Bd. 7, S. 299.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 2 (1907), S. 73.

führen kann; daß dies nicht in jedem Falle richtig zu sein braucht, soll später gezeigt werden.

Als Nährlösung diente uns bei unseren Untersuchungen hauptsächlich Bierwürze (helle) aus der Heidelberger Aktienbrauerei vormals Kleinlein. Außerdem wurde auch noch aus folgendem Grunde Hefewasser mit in den Bereich der Untersuchungen gezogen. Es liegt die Möglichkeit vor, daß die Hefe, wenn sie in einem reichlich Zucker enthaltenden Medium, wie es ja die Bierwürze ist, wächst, in welchem also eine eigentliche alkoholische Gärung eintritt, nur die Ameisensäure weiter verändert, welche nach der Schadeschen Theorie beim Zerfall des Zuckers entsteht. Besser ausgedrückt vielleicht, daß nur soviel Ameisensäure umgewandelt wird, als dem angegriffenen Zucker entspricht. Wächst nun aber die Hefe in Hefewasser, einem Medium, welches keinen oder nur geringe Mengen Zucker enthält, in welchem daher auch keine eigentliche alkoholische Gärung eintreten kann, so müßte sie eventuell imstande sein, größere Mengen zugesetzter Ameisensäure zu zerlegen.

Als Versuchsgefäße wurden durch einen Wattepfropfen verschlossene, bei 130° sterilisierte Erlenmeyer-Kölbchen von 200 ccm Inhalt benutzt. Die Füllung der Kölbchen mit der betreffenden Nährlösung geschah in folgender Weise: 50 ccm einer Lösung von 13,612 g Natriumformiat in 1 l Wasser wurden in die vorher sterilisierten Erlenmeyer-Kölbchen eingefüllt und 45 ccm der betreffenden Nährlösung (Würze oder Hefewasser) hinzugefügt; jedes der Kölbchen enthielt nun 95 ccm Flüssigkeit und darin aufgelöst  $\frac{1}{100}$  Mol. Ameisensäure als Natriumsalz. (Ein direktes Auflösen des Natriumformiates in der Würze ist nicht zu empfehlen, da das lästige Schäumen ein genaues Abfüllen erschwert.) Nach der Füllung wurden die Kölbchen 20–30 Minuten im Dampftopf sterilisiert. Die Impfung der einzelnen Kölbchen mit der zu untersuchenden Hefeart wurde in folgender Weise ausgeführt: von der Originalkultur wurde eine Platinöse voll abgenommen und auf schrägem Würzeagar ausgestrichen. Nach 24 Stunden wurde von dieser neu angegangenen Kultur eine Öse voll in 100 ccm Nährflüssig-

keit gegeben, durch Schütteln für eine gute Verteilung gesorgt und 24 Stunden bei der Temperatur stehen gelassen, bei welcher die Versuchsreihe ausgeführt werden sollte. Nach dieser Zeit wurden mit einer sterilen Pipette 5 ccm Kulturflüssigkeit herausgenommen und in die vorher mit der Natriumformiatlösung beschickten Kolben eingefüllt. Die Kulturkolben enthielten jetzt auf 100 ccm Nährflüssigkeit 0,4601 g =  $\frac{1}{100}$  Mol. Ameisensäure als Natriumformiat. Die so vorbereiteten Kölbchen wurden dann in Ostwaldsche Thermostaten gestellt und nach je 24 Stunden so viele herausgenommen, als Parallelbestimmungen ausgeführt werden sollten. Sie wurden im Dampftopf sterilisiert, der Inhalt in die Destillationskolben übergespült, nach dem Ansäuern mit Phosphorsäure die Ameisensäure abdestilliert und nach der von Hartwig Franzen und F. Egger<sup>1)</sup> angegebenen Methode bestimmt.

Folgende von Král in Prag bezogene Hefereinkulturen wurden in den Bereich der Untersuchungen gezogen:

- Saccharomyces cerevisiae I
- » ellipsoideus I
- » ellipsoideus II
- » Pastorianus I
- » Pastorianus II
- » Pastorianus III
- » Logos
- » niger

Torula Jörgensen

- » pulcherrima

Stellhefe aus der Aktienbrauerei Kleinlein.

Alle Kulturen wurden auf Würzeagar weiter gezüchtet und alle 4 Wochen umgeimpft.

<sup>1)</sup> Journ. f. pr. Chem. (2), Bd. 83 (1911), S. 323.

**Saccharomyces cerevisiae I Hansen.**

Tabelle Nr. 1.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7897	0,4681	101,70	+ 0,0070	+ 1,70
2	4,7202	0,4613	100,23	+ 0,0012	+ 0,23
3	4,7383	0,4630	100,40	+ 0,0029	+ 0,40
4	4,7020	0,4595	98,84	- 0,0006	- 0,16
5	4,7391	0,4634	100,70	+ 0,0034	+ 0,70

Tabelle Nr. 2.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7103	0,4603	100,02	+ 0,0002	+ 0,02
2	4,6893	0,4583	99,60	- 0,0018	- 0,40
3	4,7325	0,4625	100,50	+ 0,0024	+ 0,50
4	4,7170	0,4609	100,16	+ 0,0008	+ 0,16

Tabelle Nr. 3.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7162	0,4609	100,15	+ 0,0008	+ 0,15
2	4,7259	0,4618	100,36	+ 0,0017	+ 0,36
3	4,7391	0,4631	100,66	+ 0,0030	+ 0,66
4	4,7490	0,4640	100,86	+ 0,0039	+ 0,86
5	4,6893	0,4583	99,58	- 0,0018	- 0,42

Tabelle Nr. 4.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7026	0,4596	96,86	— 0,0005	— 0,14
2	4,7272	0,4619	100,38	+ 0,0018	+ 0,38
3	4,7185	0,4611	100,20	+ 0,0011	+ 0,20
4	4,7484	0,4640	100,86	+ 0,0039	+ 0,86

Die Kulturen in der Würze entwickeln sich sehr kräftig, während die in Hefewasser weniger gut angehen. In beiden Nährlösungen ist ein geringes Anwachsen der Ameisensäuremenge zu beobachten. Die Übereinstimmung der einzelnen Werte ist bei Tabelle 1 und 2 nicht besonders gut, während Tabelle 3 und 4 eine befriedigende Übereinstimmung zeigen.

*Saccharomyces ellipsoideus* I.

Tabelle Nr. 5.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7129	0,4605	100,10	+ 0,0004	+ 0,10
2	4,6579	0,4552	98,93	— 0,0049	— 1,07
3	4,6053	0,4501	97,81	— 0,0100	— 2,19
4	4,4224	0,4322	93,92	— 0,0279	— 6,08

Tabelle Nr. 6.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH g	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7242	0,4616	100,30	+ 0,0015	+ 0,30
2	4,6247	0,4520	98,22	— 0,0081	— 1,78
3	4,5940	0,4490	97,57	— 0,0111	— 2,43
4	4,4191	0,2320	93,85	— 0,0271	— 6,15

Tabelle Nr. 7.  
Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7401	0,4632	100,65	+ 0,0031	+ 0,65
2	4,7163	0,4609	100,15	+ 0,0008	+ 0,15
3	4,7055	0,4598	99,90	- 0,0002	- 0,10
4	4,6780	0,4572	99,32	- 0,0029	- 0,68
5	4,5757	0,4472	97,17	- 0,0129	-- 2,83

Tabelle Nr. 8.  
Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7414	0,6434	100,68	+ 0,0033	+ 0,68
2	4,7305	0,4622	100,44	+ 0,0011	+ 0,44
3	4,7079	0,4601	100,00	- 0,0000	- 0,00
4	4,6732	0,4567	99,44	- 0,0034	- 0,56

Bei den Versuchsreihen mit *Saccharomyces ellipsoideus* I ist am ersten Tage eine Vermehrung der Ameisensäure zu beobachten. Dann fängt aber die Ameisensäure an zu verschwinden und nach 4 Tagen sind in Würze im Mittel 6,12%, in Hefewasser 0,62% der zugesetzten Ameisensäure verschwunden. Die Übereinstimmung der Werte ist in diesen Versuchsreihen recht befriedigend.

#### *Saccharomyces ellipsoideus* II.

Auch hier findet, ebenso wie bei *Saccharomyces ellipsoideus* I, zunächst Ameisensäureproduktion statt, dann tritt aber Vergärung ein. Hier geht die Vergärung in Hefewasser etwas weiter als in Würze. Die Menge der vergorenen Ameisensäure ist in Würze nicht so groß, wie bei *Saccharomyces ellipsoideus* I, während sie in Hefewasser bedeutend größer ist.

Tabelle Nr. 9.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7544	0,4646	100,95	+ 0,0046	+ 0,95
2	4,7018	0,4595	99,86	— 0,0006	— 0,14
3	4,6433	0,4538	98,62	— 0,0063	— 1,38
4	4,6190	0,4513	98,10	— 0,0088	— 1,90
5	4,5960	0,4492	97,61	— 0,0109	— 2,39

Tabelle Nr. 10.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7380	0,4630	100,62	+ 0,0029	+ 0,62
2	4,6773	0,4571	99,34	— 0,0030	— 0,66
3	4,6088	0,4504	97,89	— 0,0097	— 2,11
4	4,6707	0,4563	99,17	— 0,0038	— 0,83

Tabelle Nr. 11.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7025	0,4595	99,86	— 0,0006	— 0,14
2			verunglückt		
3	4,6499	0,4544	98,74	— 0,0057	— 1,26
4	4,5952	0,4491	97,59	— 0,0110	— 2,41

Tabelle Nr. 12.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,6915	0,4585	99,63	— 0,0016	— 0,37
2	4,6689	0,4563	99,15	— 0,0038	— 0,85
3	4,6351	0,4530	98,43	— 0,0071	— 1,57
4	4,6153	0,4510	98,00	— 0,0091	— 2,00
5	4,5526	0,4449	96,68	— 0,0152	— 3,32

*Saccharomyces Pastorianus* I.

Tabelle Nr. 13.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7364	0,4628	100,60	+ 0,0027	+ 0,60
2	4,6742	0,4571	99,34	— 0,0030	— 0,66
3			verunglückt		
4	4,6686	0,4563	90,40	— 0,0038	— 0,60

Tabelle Nr. 14.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7229	0,4616	100,30	+ 0,0015	+ 0,30
2	4,6877	0,4581	99,56	— 0,0020	— 0,44
3	4,7021	0,4595	99,86	— 0,0006	— 0,14
4	4,6842	0,4578	99,48	— 0,0023	— 0,52
5	4,7044	0,4597	99,90	— 0,0004	— 0,10

Tabelle Nr. 15.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,6980	0,4591	99,76	— 0,0010	— 0,24
2	4,6657	0,4560	99,07	— 0,0041	— 0,93
3	4,6901	0,4583	99,59	— 0,0018	— 0,41
4	4,6678	0,4562	99,12	— 0,0039	— 0,88

Tabelle Nr. 16.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7372	0,4629	100,57	+ 0,0018	+ 0,57
2	4,7142	0,4607	100,10	+ 0,0005	+ 0,10
3	4,6867	0,4580	99,52	— 0,0021	— 0,48
4	4,6734	0,4567	99,24	— 0,0034	— 0,76
5	Schimmelpilz in die Kulturflüssigkeit hineingekommen und 19,84% vergoren.				

Auch hier findet in den ersten Tagen eine Bildung von Ameisensäure statt, während an den folgenden Ameisensäure verschwindet; die Menge der verschwundenen Ameisensäure ist aber nur recht geringfügig.

**Saccharomyces Pastorianus II.**

Tabelle Nr. 17.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7547	0,4646	100,98	+ 0,0055	+ 0,98
2	4,7150	0,4608	100,15	+ 0,0007	+ 0,15
3	4,6584	0,4553	98,94	— 0,0048	— 1,06
4	4,6143	0,4510	98,00	— 0,0091	— 2,00
5	4,6143	0,4510	98,00	— 0,0091	— 2,00

Tabelle Nr. 18.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,6930	0,4586	99,66	— 0,0015	— 0,34
2	4,6837	0,4577	99,46	— 0,0024	— 0,54
3	4,6479	0,4542	98,70	— 0,0059	— 1,30
4	4,6026	0,4498	97,74	— 0,0103	— 2,26

Tabelle Nr. 19.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Nach vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7086	0,4601	100,00	± 0,0000	± 0,00
2	4,6842	0,4578	99,47	— 0,0023	— 0,53
3	4,6483	0,4543	98,71	— 0,0058	— 1,29
4	4,6013	0,4497	97,71	— 0,0104	— 2,29
5	4,5565	0,4453	96,76	— 0,0144	— 3,24

In Bierwürze bildet sich innerhalb des ersten Tages Ameisensäure, dann setzt aber Vergärung ein, welche bis zu 2% der zugesetzten Menge ansteigt. In Hefewasser ist keine Produktion zu beobachten, sondern die Vergärung setzt sofort ein und geht weiter als bei der Versuchsreihe mit Bierwürze. Die Übereinstimmung in den Versuchsreihen ist recht befriedigend.

### Saccharomyces Pastorianus III.

In Bierwürze findet bei 27° keine Bildung von Ameisensäure statt, sondern die Vergärung setzt sofort recht kräftig ein, um nach 5 Tagen bis zu dem hohen Betrage von 17,55% der zugesetzten Menge anzusteigen. Eine viel später (ca. 1/2 Jahr) angesetzte Versuchsreihe (Tabelle 20a) zeigt dieselbe kräftige Vergärung der Ameisensäure durch *Saccharomyces Pastorianus*.

Tabelle Nr. 20.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,6489	0,4543	98,74	— 0,0068	— 1,26
2	4,4767	0,4375	95,08	— 0,0226	— 4,92
3	4,1042	0,4011	87,16	— 0,0580	— 12,84
4	3,9404	0,3851	83,69	— 0,0750	— 16,31
5	3,8823	0,3794	82,45	— 0,0807	— 17,55

Tabelle Nr. 20a.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7338	0,4626	100,57	+ 0,0015	+ 0,57
2	4,4963	0,4394	95,50	— 0,0207	— 4,50
3	4,3305	0,4232	91,98	— 0,0369	— 8,02
4	4,0011	0,3910	84,98	— 0,0691	— 15,02

Tabelle Nr. 21.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7083	0,4601	100,00	+ 0,0000	+ 0,0
2	4,6550	0,4549	98,85	— 0,0052	— 1,15
3	4,6120	0,4507	98,16	— 0,0094	— 1,84
4	4,5900	0,4486	97,47	— 0,0116	— 2,53

Tabelle Nr. 22.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,6900	0,4583	99,60	— 0,0018	— 0,4
2	4,6420	0,4534	98,53	— 0,0067	— 1,47
3	4,6282	0,4524	98,27	— 0,0077	— 1,73
4	4,5791	0,4475	97,24	— 0,0126	— 2,76
5	4,5881	0,4484	97,31	— 0,0117	— 2,69

Tabelle Nr. 23.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 17°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7817	0,4673	101,56	+ 0,0072	— 1,56
2	4,6460	0,4540	98,66	— 0,0061	— 1,34
3	4,5256	0,4423	96,13	— 0,0178	— 3,87
4	4,4376	0,4337	94,47	— 0,0264	— 5,53

Tabelle Nr. 24.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 17°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7676	0,4659	101,26	+ 0,0058	+ 1,26
2	4,6237	0,4519	98,21	— 0,0082	— 1,79
3	4,5142	0,4411	95,88	— 0,0192	— 4,12
4	4,4309	0,4330	94,11	— 0,0271	— 5,89
5	0,4050	0,4305	93,55	— 0,0296	— 6,45

In Hefewasser tritt bei 27° ebenfalls keine Bildung von Ameisensäure ein, jedoch setzt die Vergärung viel langsamer ein, um

auch nur zu dem Betrage von 2,69% anzusteigen. Bei 17° zeigt sich in Bierwürze wieder das gewohnte Bild: es findet zunächst Bildung von Ameisensäure statt, die dann aber einer Vergärung Platz macht. Bei 17° erreicht die Vergärung auch nicht so hohe Werte wie bei 27°: nach 5 Tagen sind 6,45% verschwunden.

### Saccharomyces Logos.

Tabelle Nr. 25.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,6279	0,4523	98,30	— 0,0078	— 1,70
2	4,5255	0,4422	96,12	— 0,0179	— 3,88
3	4,4472	0,4346	94,46	— 0,0254	— 5,54
4	4,2965	0,4199	91,26	— 0,0402	— 8,74
5	4,2583	0,4165	90,45	— 0,0436	— 9,55

Tabelle Nr. 26.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch- vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,6200	0,4515	98,13	— 0,0086	— 1,87
2	4,5243	0,4421	96,10	— 0,0180	— 3,90
3	4,4214	0,4321	93,91	— 0,0280	— 6,09
4	4,3181	0,4220	91,71	— 0,0381	— 8,29

Bei *Saccharomyces Logos* setzt ebenso wie bei *Saccharomyces Pastorianus* III in Bierwürze bei 27° die Vergärung sofort ein, um nach 5 Tagen den recht beträchtlichen Wert von 9,55% der zugesetzten Menge Ameisensäure zu erreichen.

**Saccharomyces niger.**

Tabelle Nr. 27.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7852	0,4676	101,64	+ 0,0075	+ 1,64
2	4,8021	0,4693	101,97	+ 0,0092	+ 1,97
3	4,8352	0,4725	102,68	+ 0,0124	+ 2,68
4	4,8010	0,4692	101,97	+ 0,0091	+ 1,97
5	4,8021	0,4693	102,00	+ 0,0092	+ 2,00

Tabelle Nr. 28.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7801	0,4671	101,50	+ 0,0070	+ 1,50
2			verunglückt		
3	4,8368	0,4727	102,74	+ 0,0126	+ 2,74
4	4,8102	0,4700	102,16	+ 0,0099	+ 2,16

Bei dieser Hefenart tritt überhaupt keine Vergärung ein, sondern es wird ausschließlich Ameisensäure gebildet, deren Menge von Tag zu Tag langsam ansteigt.

**Torula pulcherrima.**

Tabelle Nr. 29.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7201	0,4613	100,33	+ 9,0012	+ 0,33
2	4,5779	0,4474	97,24	— 0,0127	— 2,76
3	4,5535	0,4460	96,93	— 0,0141	— 3,07
4	5,5001	0,4398	95,58	— 0,0203	— 4,42

Tabelle Nr. 30.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7403	0,4632	100,70	+ 0,0029	+ 0,70
2	4,5949	0,4490	97,60	— 0,0101	— 2,40
3	4,5313	0,4428	96,24	— 0,0173	— 3,76
4	4,4951	0,4393	95,48	— 0,0208	— 4,52
5	4,4240	0,4323	93,97	— 0,0278	— 6,03

Tabelle Nr. 31.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7407	0,4633	100,70	+ 0,0032	+ 0,70
2	4,7132	0,4606	100,11	+ 0,0005	+ 0,11
3	4,5638	0,4460	96,94	— 0,0141	— 3,06
4	4,5186	0,4417	95,97	— 0,0184	— 4,03
5	4,4853	0,4383	95,27	— 0,0218	— 4,73

Tabelle Nr. 32.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7528	0,4645	100,95	+ 0,0044	+ 0,95
2	4,7233	0,4616	100,32	+ 0,0015	+ 0,32
3	4,5427	0,4439	96,49	— 0,0162	— 3,51
4	4,5040	0,4402	95,67	— 0,0199	— 4,33

Tabelle Nr. 33.  
Nährboden: Bierwürze. Temp. 17°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7792	0,4670	101,51	+ 0,0069	+ 1,51
2	4,7792	0,4670	101,51	+ 0,0069	+ 1,51
3	4,7784	0,4669	101,50	+ 0,0068	+ 1,50
4	4,7537	0,4646	100,97	+ 0,0045	+ 0,97
5	4,6231	0,4518	98,19	- 0,0083	- 1,81

Tabelle Nr. 34.  
Nährboden: Bierwürze. Temp. 17°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7763	0,4668	101,45	+ 0,0067	+ 1,45
2	4,7639	0,4655	101,19	+ 0,0054	+ 1,19
3	4,7810	0,4672	101,55	+ 0,0071	+ 1,55
4	4,7404	0,4633	100,69	+ 0,0032	+ 0,69

Hier findet in Bierwürze bei 27°, wie bei den meisten anderen Hefearten, zunächst eine geringfügige Bildung von Ameisensäure statt, die aber schon am zweiten Tage einem Verschwinden Platz macht; die Menge der vergorenen Ameisensäure steigt nach 5 Tagen bis auf 6,03% der zugesetzten Menge an. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei 27° in Hefewasser. Auch hier findet zunächst Bildung statt, aber die Menge der gebildeten Ameisensäure ist etwas größer als in Bierwürze bei derselben Temperatur; die Vergärung setzt dann langsamer ein, um nach 5 Tagen den Betrag von 4,73% zu erreichen. In Bierwürze bei 17° wird zunächst Ameisensäure gebildet, und zwar bedeutend mehr als in Bierwürze und Hefewasser bei 27°. Die Menge der gebildeten Ameisensäure hält sich dann 4 Tage auf annähernd derselben Höhe; erst innerhalb des 5. Tages tritt eine Vergärung ein, die aber nur einen Betrag von 1,81% erreicht.

**Torula Jörgensen (Rosahefe).**

Tabelle Nr. 35.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,8001	0,4691	101,96	+ 0,0090	+ 1,96
2	4,7602	0,4652	101,11	+ 0,0051	+ 1,11
3	4,8127	0,4703	102,22	+ 0,0102	+ 2,22
4	4,7730	0,4664	101,38	+ 0,0063	+ 1,38
5	4,8121	0,4703	102,22	+ 0,0102	+ 2,22

Tabelle Nr. 36.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren % HCOOH	Vergoren HCOOH g
1	4,7892	0,4680	101,73	+ 0,0079	+ 1,73
2	4,8218	0,4712	102,42	+ 0,0101	+ 2,42
3	4,7972	0,4688	101,96	+ 0,0087	+ 1,96
4	4,7674	0,4659	101,26	+ 0,0058	+ 1,26
5	4,8125	0,4703	102,22	+ 0,0102	+ 2,22

Tabelle Nr. 37.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCNOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7882	0,4679	101,73	+ 0,0078	+ 1,73
2	4,7393	0,4632	100,67	+ 0,0031	+ 0,67
3	4,7642	0,4656	101,20	+ 0,0055	+ 1,20
4	4,7467	0,4645	100,96	+ 0,0044	+ 0,96
5	4,7812	0,4672	101,55	+ 0,0071	+ 1,55

Tabelle Nr. 38.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,8375	0,4730	102,80	+ 0,0129	+ 2,80
2	4,7317	0,4624	100,50	+ 0,0023	+ 0,50
3	4,7661	0,4758	101,23	+ 0,0057	+ 1,23
4	4,7513	0,4643	100,90	+ 0,0042	+ 0,90

Tabelle Nr. 39.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Nach vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7300	0,4622	100,47	+ 0,0021	+ 0,47
2	4,7458	0,4638	100,80	+ 0,0037	+ 0,80
3	4,7218	0,4614	100,29	+ 0,0013	+ 0,29
4	4,7365	0,4629	100,60	+ 0,0028	+ 0,60
5	4,7069	0,4600	99,97	— 0,0001	— 0,03

Tabelle Nr. 40.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7008	0,4594	99,82	— 0,0007	— 0,18
2	4,7191	0,4612	100,23	+ 0,0011	+ 0,23
3	4,7105	0,4603	100,05	+ 0,0002	+ 0,05
4	4,7118	0,4604	100,08	+ 0,0003	+ 0,08

Die 4 Versuchsreihen bei 27° in Bierwürze zeigen übereinstimmend eine recht beträchtliche Bildung von Ameisensäure: eine einigermaßen erhebliche Vergärung tritt überhaupt nicht ein. Versuchsreihe 37 und 38 wurde ca. 1/2 Jahr später aus-

geführt als die beiden andern. Veranlassung zu dieser Wiederholung gab die eigentümliche Erscheinung, daß abwechselnd ein Bilden und Verschwinden von Ameisensäure eintritt. Alle 4 Versuchsreihen zeigen diese Erscheinung in recht charakteristischer Weise. Eine ähnliche pulsierende Gärung wurde auch von Buchner und Meisenheimer bei der Vergärung von Milchsäure mit Hefepreßsaft beobachtet. — Die Übereinstimmung der 4 Versuchsreihen ist, trotzdem ein Zwischenraum von  $\frac{1}{2}$  Jahr dazwischen liegt, eine recht befriedigende. In Hefewasser bei  $27^{\circ}$  tritt ebenfalls Bildung von Ameisensäure ein, nur ist hier ihre Menge nicht so groß wie in Bierwürze bei derselben Temperatur. Auch hier läßt sich ein Pulsieren der Gärung, wenn auch nicht so deutlich, beobachten.

## Stellhefe Kleinlein.

Tabelle Nr. 41.

Nährboden: Bierwürze. Temp.  $27^{\circ}$ .

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,4734	0,4372	95,02	— 0,0229	— 4,98
2	4,4780	0,4376	95,11	— 0,0225	— 4,89
3	4,4678	0,4367	94,90	— 0,0234	— 5,10
4	4,4650	0,4364	95,05	— 0,0237	— 4,95

Tabelle Nr. 42.

Nährboden: Bierwürze. Temp.  $27^{\circ}$ .

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,5462	0,4443	96,56	— 0,0158	— 3,44
2	4,5221	0,4419	96,05	— 0,0182	— 3,95
3	4,4727	0,4371	95,00	— 0,0230	— 5,00
4	4,4733	0,4372	95,01	— 0,0229	— 4,99
5	4,4726	0,4371	95,00	— 0,0230	— 5,00

Tabelle Nr. 43.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7488	0,4641	100,84	+ 0,0040	+ 0,84
2	4,7319	0,4624	100,49	+ 0,0023	+ 0,49
3	4,7120	0,4605	100,06	+ 0,0004	+ 0,06
4	4,7188	0,4611	100,20	+ 0,0011	+ 0,20

Tabelle Nr. 44.

Nährboden: Hefewasser. Temp. 27°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7447	0,4637	100,78	+ 0,0036	+ 0,78
2	4,7327	0,4625	100,50	+ 0,0024	+ 0,50
3	4,7151	0,4608	100,10	+ 0,0007	+ 0,10
4	4,7158	0,4609	100,14	+ 0,0008	+ 0,14
5	4,7152	0,4609	100,14	+ 0,0008	+ 0,14

Tabelle Nr. 45.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 17°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7520	0,4644	100,93	+ 0,0043	+ 0,93
2	4,7125	0,4605	100,10	+ 0,0004	+ 0,10
3	4,6684	0,4652	99,16	- 0,0039	- 0,84
4	4,5748	0,4471	95,17	- 0,0130	- 2,83

Tabelle Nr. 46.

Nährboden: Bierwürze. Temp. 17°.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7420	0,4634	100,72	+ 0,0033	+ 0,72
2	4,7200	0,4615	100,30	+ 0,0014	+ 0,30
3	4,6700	0,4564	99,19	- 0,0037	- 0,81
4	4,5495	0,4446	96,64	- 0,0155	- 3,36
5	4,5500	0,4447	96,64	- 0,0156	- 3,36

Bei dieser Hefeart tritt sofort eine sehr kräftige Vergärung der Ameisensäure ein, welche bis zum fünften Tage langsam ansteigt. Bildung von Ameisensäure tritt überhaupt nicht ein. In Hefewasser bei derselben Temperatur tritt zunächst Bildung von Ameisensäure ein; weiterhin wird sie dann sehr langsam vergoren, so daß auch noch nach 5 Tagen mehr Ameisensäure vorhanden ist, als zugesetzt wurde. Bei 17° in Bierwürze tritt zunächst Bildung von Ameisensäure ein, welche dann aber einem Verschwinden Platz macht, so daß nach 5 Tagen immerhin 3,36% vergoren sind.

Aus diesen Versuchsreihen geht klar hervor, daß manche Hefearten recht beträchtliche Mengen Ameisensäure zu vergären vermögen, und daß meistens zunächst eine Bildung von Ameisensäure eintritt. Die früher gemachte Voraussetzung, daß eventuell in Hefewasser mehr Ameisensäure vergoren wird als in Würze, trifft nur in Ausnahmefällen zu; im Gegenteil, in Würze wird meistens vielmehr Ameisensäure vergoren als in Hefewasser.

Das Auftreten von Ameisensäure bei der alkoholischen Gärung ist schon verschiedentlich beobachtet worden. So fanden Rayman und Kruis<sup>1)</sup> diese Säure in vergorenen Würzen, welche lange Jahre mit Hefe gestanden hatten. Der Alkohol

<sup>1)</sup> Chemisch-biologische Studien, Bd. 1; zitiert nach Thomas. Comptes rend., Bd. 136, S. 315, und Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 4, S. 384.

war hierbei zu Kohlensäure und Wasser oxydiert und die Eiweißstoffe zu Aminen und Ammoniumsalzen organischer Säuren abgebaut worden; es war anstatt der Gärtätigkeit anscheinend eine Atmungstätigkeit eingetreten. Auch in lange gestandenen sterilisierten Bierwürzen wurde sie von diesen Forschern aufgefunden. Ihre Bildung wird deshalb nicht der Gärtätigkeit der Hefen, sondern einem spontan verlaufenden Eiweißabbau in der Würze zugeschrieben. Khoudobaschian<sup>1)</sup> fand Ameisensäure in frischem Most und beobachtete, daß ihre Menge, namentlich wenn den Hefen schlechte Lebensbedingungen geboten wurden, zunahm. Nach Leo Liebermann<sup>2)</sup> und nach Kitiesan<sup>3)</sup> kommt Ameisensäure normalerweise in Weinen vor: sie wird aber, wie Duclaux<sup>4)</sup> beobachtete, durch Hefen zum Verschwinden gebracht. Weitere Aufschlüsse über die Bildung von Ameisensäure bei der Gärung verdanken wir Thomas.<sup>5)</sup> Er konnte die Gärungsbedingungen so ändern, daß er statt Alkohol und Kohlendioxyd reichliche Mengen Ameisensäure erhielt. Er benutzte für seine Versuche künstliche Nährböden, welche die üblichen Mineralsalze, Zucker und erhebliche Mengen einer Stickstoffverbindung enthielten. Als Stickstoffquellen wurden verwendet: Urin mit einem Zusatz von Ammoniumbicarbonat, Formamid, Acetamid oder Butyramid mit einem Zusatz von kohlen-saurem, schwefelsaurem, essigsaurem, bernsteinsaurem oder asparaginsaurem Ammoniak. Die Ameisensäurebildung war am größten bei gleichzeitiger Anwesenheit von Urin und asparaginsaurem Ammoniak. Durch Zusatz von Calciumcarbonat konnte die Ameisensäurebildung noch um ein beträchtliches gesteigert werden. Auch bei der Preßsaftgärung ist die Bildung von Ameisensäure durch Buchner und Meisenheimer<sup>6)</sup> wahrscheinlich gemacht worden: sie wurde jedoch nicht mit Sicherheit als solche identifiziert. Alle diese Be-

<sup>1)</sup> Ann. de l'Inst. Pasteur, Bd. 6 (1892), S. 600.

<sup>2)</sup> Ber., Bd. 15 (1882), S. 437, 2553.

<sup>3)</sup> Ber., Bd. 16 (1883), S. 1179.

<sup>4)</sup> Ann. de l'Inst. Pasteur, Bd. 6 (1892), S. 593.

<sup>5)</sup> Comptes rend., Bd. 136, S. 1015.

<sup>6)</sup> Ber., Bd. 37 (1908), S. 417.

obachtungen lassen jedoch absolut nicht erkennen, ob die in vergorenen Flüssigkeiten nachgewiesene Ameisensäure wirklich der alkoholischen Gärung des Zuckers ihren Ursprung verdankt. Das Auftreten von so reichlichen Mengen Ameisensäure, wie sie Thomas bei seinen Versuchen fand, läßt sich zwanglos auf die alkoholische Gärung der Aminosäuren zurückführen, zumal besonders reichliche Mengen bei Gegenwart von Asparaginsäure gefunden wurden. Nach den Untersuchungen von F. Ehrlich (siehe später) müssen sich bei der alkoholischen Gärung der Aminosäuren reichliche Mengen Ameisensäure bilden. Über die Vergärung von Ameisensäure durch Hefen findet sich außer der schon erwähnten von Duclaux noch eine von F. Ehrlich,<sup>1)</sup> welcher ebenfalls eine reichliche Vergärung dieser Säure durch Hefen beobachtet hat, ohne jedoch die experimentellen Belege hierfür zu geben. C. Neuberg und L. Tir<sup>2)</sup> konstatierten die Entwicklung von Kohlendioxyd bei der Einwirkung von Hefe auf Lösungen von ameisen-saurem Kalium.

Woher stammt nun die Ameisensäure, die sich meistens innerhalb der ersten 24 Stunden bildet? Von vornherein liegt der Verdacht nahe, gestützt auf die Angabe von Rayman und Kruis, die in lange gestandener Bierwürze Ameisensäure fanden, daß auch in frischer so viel Ameisensäure zugegen ist, um den in den ersten 24 Stunden ermittelten Überschuß zu erklären. Es wurden deshalb quantitative Ameisensäurebestimmungen in der verwendeten Bierwürze ausgeführt.

Ein Liter drei Wochen alter Würze wurde nach Zusatz von 30 ccm 50%iger Phosphorsäure der Wasserdampfdestillation unterworfen, vier Liter Destillat aufgefangen, diese mit Natronlauge genau neutralisiert und das Ganze auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft; der Salzurückstand wurde in Wasser gelöst und die Ameisensäure in der üblichen Weise bestimmt. Es wurden so aus einem Liter Würze 0,4588 g Kalomel, entsprechend 0,0448 g Ameisensäure, erhalten. Dieser Versuch wurde noch einmal wiederholt, nur mit dem Unterschiede, daß, um genauere Resultate zu erhalten, dem durch

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 18 (1909), S. 421.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 32 (1911), S. 323.

Eindampfen gewonnenen Salzrückstand noch eine bestimmte Menge Natriumformiat zugesetzt wurde; so wurden größere Mengen Kalomel erhalten und die Fehler dadurch verkleinert. Auf diese Weise wurde in einem Liter Würze 0,0486 g Ameisensäure ermittelt, ein Wert, welcher mit dem ersten recht gut übereinstimmt. Es sind also im Mittel 0,0467 g Ameisensäure in einem Liter der von uns gebrauchten Würze enthalten. Für die einzelnen Versuche wurden nun jeweils 50 ccm Würze verwendet: es waren also von vornherein 0,0024 g Ameisensäure in jedem Kolben vorhanden. Diese schon in der Würze vorhandene Ameisensäure ist aber meistens bedeutend geringer, als die nach eintägiger Gärung gefundene. Der Überschuß stammt also jedenfalls nicht vollständig aus der Würze, sondern wird zum größten Teil erst bei der Gärung gebildet, was auch durch die folgenden Versuche noch besonders erhärtet wird.

Es wurden nämlich diejenigen Mengen Ameisensäure bestimmt, welche sich bei der Gärung in Würze bilden, wenn von vornherein keine Ameisensäure zugesetzt wird. Die Versuchskolben, welche 100 ccm sterilen Nährboden (Würze) enthielten, wurden in der früher geschilderten Weise mit Hefe geimpft, bei 27° stehen gelassen, nach je 24 Stunden ein Kölbchen herausgenommen und die Ameisensäure bestimmt. Da keine erheblichen Mengen zu erwarten waren, wurde zwecks genauer Bestimmung dem Destillat immer  $\frac{1}{100}$  Molekül Ameisensäure als Natriumformiat hinzugefügt. Nach Abzug dieser hinzugegebenen Menge von der aus dem Kalomelgewicht berechneten konnte dann die Ameisensäurebildung von Tag zu Tag verfolgt werden.

Tabelle Nr. 47.  
Hefeart: Sacch. Pastorianus III.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,8599	0,4749	103,23	+ 0,0148	+ 3,23
2	4,8321	0,4722	102,64	+ 0,0121	+ 2,64
3	4,8190	0,4709	102,33	+ 0,0108	+ 2,33
4	4,7665	0,4658	101,24	+ 0,0057	+ 1,24

Tabelle Nr. 48.

 Hefeart: *Sacch. cerevisiae*.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,8716	0,4765	103,57	+ 0,0164	+ 3,57
2	4,8510	0,4741	103,04	+ 0,0140	+ 3,04
3	4,7949	0,4686	101,85	+ 0,0085	+ 1,85
4	4,8320	0,4722	102,63	+ 0,0121	+ 2,63

Tabelle Nr. 49.

 Hefeart: *Sacch. ellipsoideus* I.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	5,0380	0,4923	107,01	+ 0,0322	+ 7,01
2	4,8324	0,4722	102,64	+ 0,0121	+ 2,64
3	4,8228	0,4713	102,44	+ 0,0112	+ 2,44
4	4,8109	0,4702	102,19	+ 0,0101	+ 2,19
5	4,8074	0,4698	102,11	+ 0,0097	+ 2,11

Tabelle Nr. 50.

 Hefeart: Stellhefe aus der Aktienbrauerei «Kleinlein»  
in Heidelberg.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,8583	0,4748	103,20	+ 0,0147	+ 3,20
2	4,8642	0,4754	103,32	+ 0,0153	+ 3,32
3	4,8046	0,4695	102,07	+ 0,0094	+ 2,07
4	4,8292	0,4719	102,57	0,0118	+ 2,57
5	4,8666	0,4756	103,37	+ 0,0155	+ 3,37

Aus diesen Versuchen geht noch viel deutlicher als aus den früheren hervor, daß die innerhalb des ersten Tages ge-

bildete Ameisensäure nicht schon ursprünglich in der Würze vorhanden ist, sondern erst durch den Gärungsprozeß neu gebildet wird. Bei diesen Versuchen macht sich auch noch die auffällige Erscheinung bemerkbar, daß die Menge der gebildeten Ameisensäure viel größer ist, als bei den alten Versuchen mit vorherigem Zusatz von Ameisensäure. Auch setzt bei diesen neuen Versuchen die Vergärung nur außerordentlich langsam ein, sodaß am 4. resp. 5. Tage immer noch ein bedeutender Überschuß an Ameisensäure vorhanden ist, während bei den alten Versuchen die Vergärung so kräftig einsetzt, daß meistens schon nach dem ersten Tage von der zugesetzten Ameisensäure vergoren wird.

Zum besseren Vergleich seien die alten und die neuen Werte noch einmal nebeneinander gesetzt

### Saccharomyces Pastorianus 3.

Mit Zusatz von Ameisensäure.

Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
— 0,0068	— 1,26
— 0,0226	— 4,92
— 0,0580	— 12,84
— 0,0750	— 16,31

Ohne Zusatz von Ameisensäure.

Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
+ 0,0148	+ 3,23
+ 0,0121	+ 2,64
+ 0,0108	+ 2,33
+ 0,0057	+ 1,24

### Saccharomyces cerevisiae.

Mit Zusatz von Ameisensäure.

Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
+ 0,0070	+ 1,70
+ 0,0012	+ 0,23
+ 0,0029	— 0,40
— 0,0006	+ 0,16

Ohne Zusatz von Ameisensäure.

Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
+ 0,0164	+ 3,57
+ 0,0140	+ 3,04
+ 0,0085	+ 1,85
+ 0,0121	+ 2,63

*Saccharomyces ellipsoideus* 1.

Mit Zusatz von Ameisensäure.

Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
+ 0,0015	+ 0,30
- 0,0081	- 1,78
- 0,0111	- 2,43
- 0,0271	- 6,15

Ohne Zusatz von Ameisensäure.

Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
+ 0,0322	+ 7,01
+ 0,0121	+ 2,64
+ 0,0112	+ 2,44
+ 0,0101	+ 2,19

## Stellhefe Kleinlein.

Mit Zusatz von Ameisensäure.

Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
- 0,0229	- 4,98
- 0,0225	- 4,89
- 0,0234	- 5,10
- 0,0237	- 4,95

Ohne Zusatz von Ameisensäure.

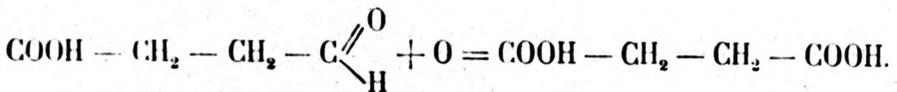
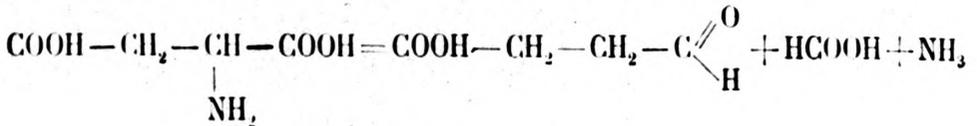
Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
+ 0,0147	+ 3,20
+ 0,0153	+ 3,32
+ 0,0094	+ 2,07
+ 0,0118	+ 2,57

Nachdem nachgewiesen worden ist, daß der bei der Gärung beobachtete Überschuß von Ameisensäure nicht schon von vorneherein in der Würze vorhanden ist, bleiben für ihre Bildung noch zwei Möglichkeiten übrig: Sie kann der eigentlichen alkoholischen Gärung, dem Zerfall des Zuckers in Alkohol und Kohlendioxyd, ihre Entstehung verdanken oder sie kann durch irgend welche nebenher laufenden Prozesse gebildet werden. Zunächst soll die zweite Möglichkeit ins Auge gefaßt werden.

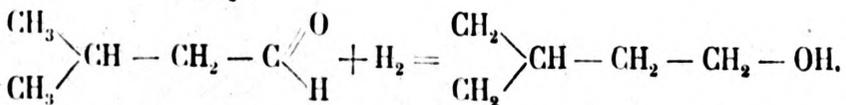
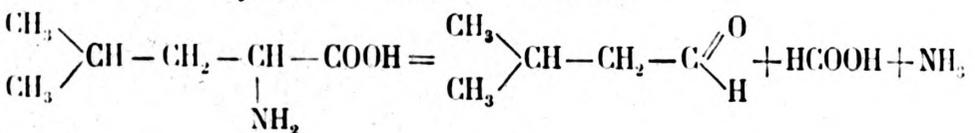
Als die wichtigsten, neben der eigentlichen alkoholischen Gärung herlaufenden Prozesse kommen die Bildung des Glycerins, der Bernsteinsäure und der Fuselöle in Betracht. Durch die Arbeiten von Buchner und Meisenheimer ist bekannt, daß das Glycerin durch einfache Reduktion des als Zwischenprodukt entstehenden Glycerinaldehydes oder Dioxyacetons entsteht: bei diesem Prozeß kann keine Ameisensäure gebildet werden. Anders liegt die Sache bei den beiden anderen Nebenprodukten, deren Bildungsweise die schönen Arbeiten von

F. Ehrlich<sup>1)</sup> aufgeklärt haben. Ehrlich hat nachgewiesen, daß sowohl die Bernsteinsäure als auch die Fuselöle bei der Gärung von Aminosäuren entstehen.

Als Muttersubstanz der Bernsteinsäure ist die Glutaminsäure anzusprechen, aus welcher sie in folgender Weise entsteht. Sie unterliegt zunächst einer Spaltung in Ameisensäure, Ammoniak und dem Halbaldehyd der Bernsteinsäure, und letzterer wird dann weiter zu Bernsteinsäure oxydiert.



Ganz gleich verläuft die Bildung des Fuselöls, aus den Aminosäuren. Für den Hauptbestandteil des Fuselöls, die Amylalkohole, kommen als Muttersubstanz das Leucin und das von Ehrlich entdeckte Isoleucin in Betracht. Das Leucin erleidet, genau wie die Glutaminsäure, eine Spaltung in Ameisensäure, Ammoniak und Isovaleraldehyd und der letztere wird dann zu Isoamylalkohol weiter reduciert.



Bei beiden Prozessen wird also neben der Bernsteinsäure und dem Amylalkohol Ameisensäure gebildet und man könnte wohl daran denken, daß die bei der alkoholischen Gärung entstehende Ameisensäure diesem Vorgang ihren Ursprung verdankt. Wenn die Ameisensäure nun ausschließlich bei diesem Prozeß gebildet wird, so muß ihre Menge in Beziehung zu der Menge der gebildeten Bernsteinsäure und dem Fuselöl stehen. Nun sind nach den Untersuchungen von Straub<sup>2)</sup> im Bier 0,0026 – 0,0039% Bernsteinsäure vorhanden und

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 1, S. 31, Bd. 2, S. 52. Ber., Bd. 40 (1907), S. 1027.

<sup>2)</sup> Forschungsber. über Lebensmittel usw., Bd. (1895), S. 382.

Chapman<sup>1)</sup> fand in 6 englischen Bieren auf 100 Teile rohen Alkohol 0,051—0,250 Teile Fuselöl. Wenn man nun annimmt, daß von den untersuchten Hefearten aus 100 ccm Würze in den ersten 24 Stunden 2 g Alkohol gebildet werden (siehe die späteren Tabellen), so müßte nach den Bestimmungen von Chapman, wenn man die höchste von ihm gefundene Zahl benutzt, 0,0050 g Amylalkohol gebildet worden sein und nach der höchsten von Straub erhaltenen Zahl 0,0039 g Bernsteinsäure. Nun entsprechen nach den weiter oben gegebenen Gleichungen 0,0050 g Amylalkohol 0,002615 g Ameisensäure und 0,0039 g Bernsteinsäure 0,001521 g Ameisensäure. Es entstehen also, wenn man diese Angaben zugrunde legt, bei der Amylalkohol- und Bernsteinsäurebildung zusammen 0,004136 g Ameisensäure. Diese Menge ist nun aber viel geringer als die tatsächlich gefundene; die kleinste der gefundenen Mengen (bei *Saccharomyces Pastorianus* III) ist 3,58 mal und die größte (bei *Saccharomyces ellipsoideus* I) 7,79 mal so groß. Auch wenn man die von vornherein in der Wage vorhandene Menge Ameisensäure noch hinzunimmt, kommt man noch lange nicht auf die gefundenen Werte. Nun sind aber die der Berechnung zugrunde gelegten Werte Maximalwerte, denn es wurden ja die höchsten der ermittelten Zahlen benutzt; außerdem sind diese Zahlen an ausgegorenen Flüssigkeiten ermittelt worden, und es ist wenigstens für die Bernsteinsäure von Effront<sup>2)</sup> nachgewiesen worden, daß ihre Menge mit jedem Tage zunimmt. Zieht man dieses auch noch in Betracht, so ist die Menge Ameisensäure, welche bei der Bildung der Bernsteinsäure und des Amylalkohols entsteht, sicher noch viel kleiner. Zu einer etwas abweichenden Auffassung der alkoholischen Gärung der Aminosäuren kommen Neubauer und Fromherz.<sup>3)</sup> Sie glauben, daß die Aminosäure zunächst in die entsprechende Ketonsäure verwandelt wird, und daß diese dann unter Abspaltung von Kohlendioxyd und darauf folgender Reduktion in den Alkohol übergeht. Nach dieser Auffassung

<sup>1)</sup> S. federated Inst. Brewing, Bd. 3 (1897), S. 240.

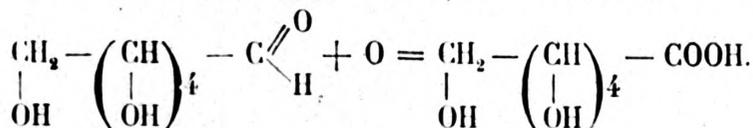
<sup>2)</sup> Comptes rend., Bd. 119 (1894), S. 169.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 70 (1911), S. 326.

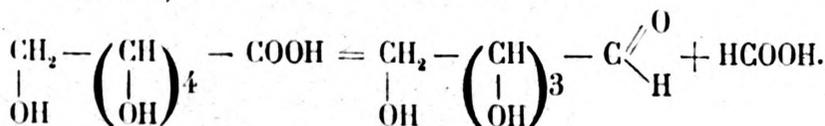
dürfte bei der alkoholischen Gärung der Aminosäuren überhaupt keine Ameisensäure gebildet werden. Soviel geht also sicher aus den angestellten Betrachtungen hervor, daß die gebildete Ameisensäure nur zum kleineren Teile oder überhaupt nicht der Gärung der Aminosäuren ihre Entstehung verdankt.

Es wäre eventuell noch an eine weitere Bildungsmöglichkeit der Ameisensäure in gärenden Flüssigkeiten zu denken. Außer der eigentlichen Gärung und der Bildung der schon erwähnten Nebenprodukte findet auch noch eine Vermehrung der Hefe, also eine Bildung neuer Körpersubstanz statt. Zum Aufbau ihres Körpers bedarf die Hefe hauptsächlich der Aminosäuren und der Kohlenhydrate, die ihr beide in reichlicher Menge von der Bierwürze geboten werden. Bevor aber diese Aminosäuren und Kohlenhydrate zum Aufbau der Körpersubstanz verwendbar sind, müssen sie, wenigstens zum Teil, umgewandelt werden. Zu dieser Umwandlung, zu dem weiteren Aufbau der Körpersubstanz, wie überhaupt zur ganzen Unterhaltung der Lebensvorgänge, sind gewisse Energiebeträge notwendig. Die grüne Pflanze gewinnt diese Energiebeträge durch Oxydation der Zuckerarten zu den sogenannten Pflanzensäuren, unter denen die Oxalsäure die verbreitetste ist; auch Kohlendioxyd wird bei dieser Verbrennung gebildet. Diese Oxydation der Zuckerarten zu den Pflanzensäuren und auch die Bildung von Kohlendioxyd kann man sich nun in folgender Weise vorstellen.

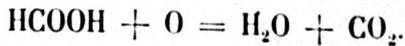
Wenn die Glukose der Einwirkung gelinde wirkender Oxydationsmittel ausgesetzt wird, so bildet sich aus der Carbonylgruppe eine Carboxylgruppe, es entsteht die Glukonsäure



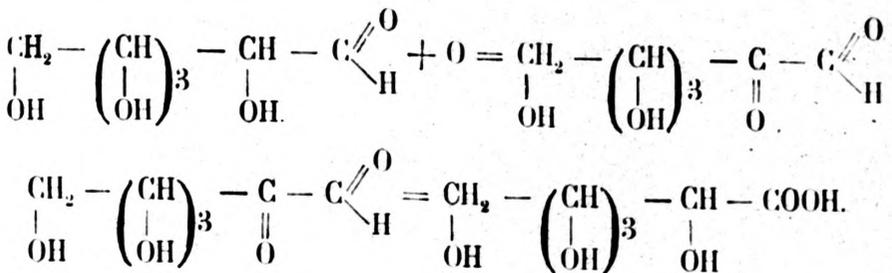
Die Glukonsäure ist nun eine  $\alpha$ -Oxysäure, und als solche wird sie geneigt sein, unter Abspaltung von Ameisensäure in einen Aldehyd, eine Pentose überzugehen.



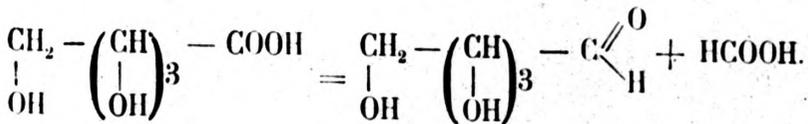
Die Ameisensäure unterliegt einer weiteren Oxydation zu Kohlendioxyd und Wasser



Die Oxydation kann auch noch in etwas anderer Weise verlaufen. Anstatt daß die Carbonylgruppe direkt zu einer Carboxylgruppe oxydiert wird, ist es möglich, daß zunächst die  $\alpha$ -ständige CH-OH-Gruppe zu einer Ketogruppe oxydiert wird unter Bildung eines Osons. Dieses Oson erleidet nun, wie es die  $\alpha$ -Ketoaldehyde im allgemeinen tun, eine Umlagerung in die betreffende  $\alpha$ -Oxysäure, in diesem Falle die Glukonsäure

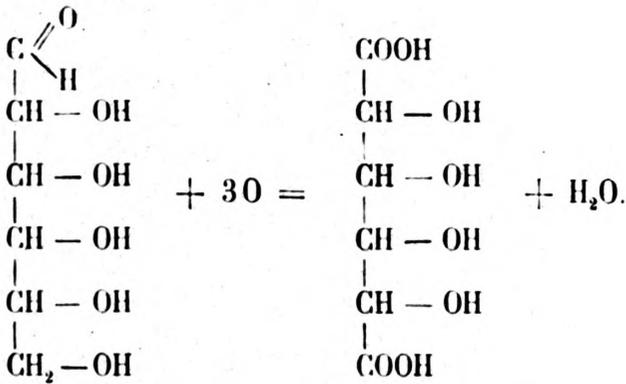


Die Pentose wird nun weiter zu einer Pentonsäure oxydiert und diese wird dann in eine Tetrose und Ameisensäure gespalten.

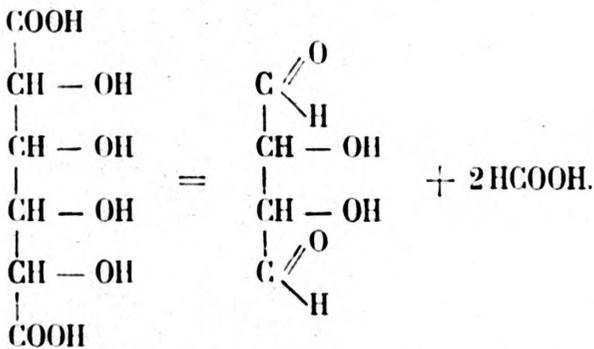


So kann man sich den Vorgang weiter fortgesetzt denken, bis man schließlich zu Glykolaldehyd, zur Glykolsäure und zum Formaldehyd gelangt. Bei der Annahme, daß der Oxydationsvorgang in der eben geschilderten Weise verläuft, stößt man auf eine Reihe von Säuren, welche außer der Ameisensäure und außer der Glykolsäure bisher nicht in den Pflanzen nachgewiesen worden sind.

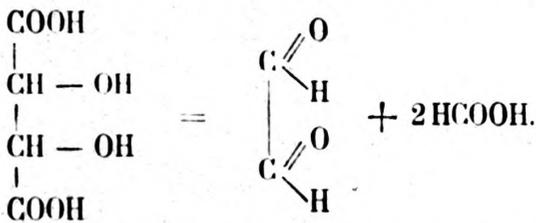
Läßt man stärkere Oxydationsmittel auf Glukose einwirken, so wird nicht nur die Aldehydgruppe oxydiert, sondern die endständige CH<sub>2</sub>-OH-Gruppe wird ebenfalls angegriffen und in eine Carboxylgruppe umgewandelt; so entsteht aus der Glukose die Zuckersäure



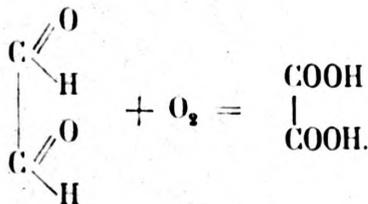
Die Zuckersäure wird nun als  $\alpha$ -Oxysäure leicht zwei Moleküle Ameisensäure abspalten und dabei in Weinsäuredialdehyd übergehen



Die Ameisensäure wird nun weiter zu Kohlendioxyd und Wasser und der Weinsäuredialdehyd zu Weinsäure oxydiert werden. Die Weinsäure unterliegt nun als  $\alpha$ -Oxysäure weiter der Spaltung und geht in Glyoxal und Ameisensäure über

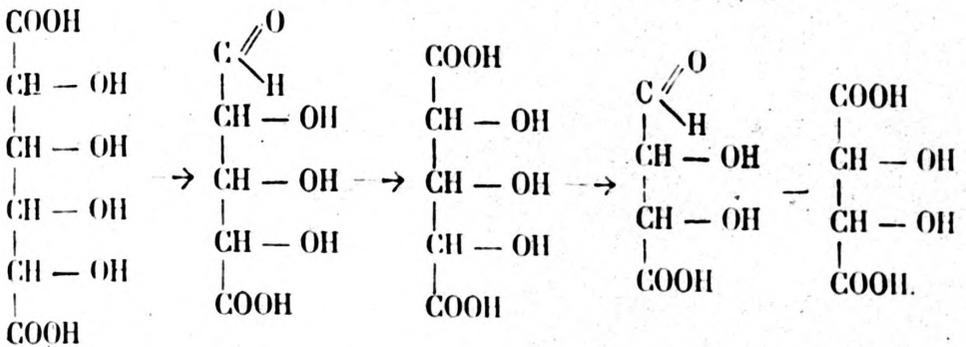


und das Glyoxal wird dann zu Oxalsäure oxydiert

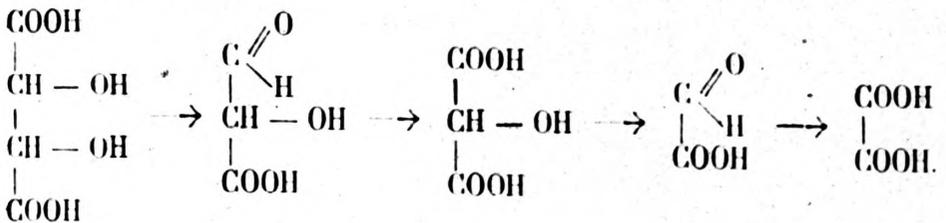


Bis jetzt ist angenommen worden, daß aus den Oxydicarbonsäuren gleichzeitig zwei Moleküle Ameisensäure abge-

spalten werden, und daß dabei Oxydialdehyde entstehen. Möglich ist aber auch, daß zunächst ein Molekül Ameisensäure abgespalten wird und sich ein Halbaldehyd bildet, der dann weiter zu einer Dicarbonsäure oxydiert wird. Von der Zuckersäure ausgehend erhält man dann folgende Reihe von Körpern:



Weitergehend von der Weinsäure erhält man eine ähnliche Reihe.



Bei dieser Annahme des Abbauvorganges stößt man außer auf Ameisensäure, Weinsäure und Oxalsäure noch auf die Glyoxylsäure, welche ebenfalls in den Pflanzen nachgewiesen worden ist. Daß tatsächlich der oxydative Abbau der Zuckerarten in der eben geschilderten Weise verlaufen kann, geht daraus hervor, daß auch bei der Oxydation von Zucker mit Salpetersäure ein großer Teil der eben aufgeführten Körper entsteht.

Auch ein Nebeneinanderherlaufen der drei Abbaureaktionen ist natürlich möglich oder andere Kombinationen.

Auch der oxydative Abbau der Kohlenhydrate im Tierkörper wird wohl in ähnlicher Weise verlaufen; d. h. es tritt Oxydation zu einer  $\alpha$ -Oxysäure ein und diese wird in einen Aldehyd und Ameisensäure gespalten; die Ameisensäure wird weiter zu Kohlendioxyd und Wasser oxydiert und der Aldehyd wieder zu einer  $\alpha$ -Oxysäure, welche dann neuerdings gespalten wird. Zur Bestätigung dieses Oxydationsverlaufes im Tierkörper wäre es sehr wichtig, nachzuweisen, daß er diese Säure zu ver-

brennen vermag und daß sie wenigstens spurenweise in ihm vorkommt.

Bei diesem eben geschilderten Vorgang der Zuckeroxydation zwecks Energiegewinnung werden nun reichliche Mengen von Ameisensäure als Zwischenprodukt gebildet; ja die ganze Kette wird unter Umständen vollständig über die Ameisensäure in Kohlendioxyd verwandelt.

Es wäre ja möglich, daß auch die Hefe die ihr notwendige Energie einem derartigen oxydativen Zuckerabbau entnimmt. Dagegen spricht aber, daß die alkoholische Gärung ein anaerober Prozeß ist, also ohne Mitwirkung von freiem Sauerstoff verläuft, und daß die Pflanzensäuren, namentlich die Oxalsäure, nur in äußerst geringer Menge in gärenden Flüssigkeiten vorkommen. Bei der Alkoholgärung durch Hefen ist Oxalsäure überhaupt nicht mit Sicherheit nachgewiesen worden. Die in der Hefe öfters beobachteten Oxalatkristalle können ebensogut aus schon vorher in der Würze vorhandener Oxalsäure stammen.<sup>1)</sup> Die Hefe braucht ja auch gar keine Energie durch oxydativen Zuckerabbau zu gewinnen, da ihr reichliche Energiemengen aus dem Zerfall des Zuckers in Alkohol und Kohlendioxyd zur Verfügung stehen.

Die bei der alkoholischen Gärung auftretende Ameisensäure kann also auch nicht dieser Quelle entstammen, und es bleibt nichts anderes übrig, als anzunehmen, daß sie beim eigentlichen Zerfall des Zuckers in Alkohol und Kohlendioxyd entsteht.

Die durch die erhaltenen Zahlen ausgedrückten Mengen gebildeter und vergorener Ameisensäure entsprechen nun sicher nicht den tatsächlichen Verhältnissen; die Mengen werden, auch wenn man sich nicht von vornherein auf das Wohl-Schadesche Schema festlegt, bedeutend größer sein, wie folgende Überlegung lehrt.

In die Kolben wird eine recht beträchtliche Menge junger, gärkräftiger Hefe eingesät; sie findet hier ein ausgezeichnetes Nährmaterial, und ihre Entwicklung setzt sofort kräftig ein. Diese

<sup>1)</sup> Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 4, S. 383.

besonders kräftige Entwicklung verläuft innerhalb der ersten 24 Stunden, denn in dieser Zeit wird, wie aus den später gegebenen Tabellen hervorgeht, die größte Menge Alkohol gebildet. Innerhalb der zweiten 24 Stunden findet auch noch eine kräftige Entwicklung statt, aber nicht mehr so, wie in den ersten; später verläuft sie dann langsamer. Das Stadium der Ameisensäurebildung fällt also mit dem Stadium der besonders energischen Sproßtätigkeit der Hefe, mit dem Vorhandensein besonders vieler junger gärkräftiger Zellen, zusammen, während das Stadium der Ameisensäurevergärung mit einer langsameren Entwicklung zusammenfällt. Nun sind aber auch schon während der ersten 24 Stunden sicher Zellen vorhanden, die ihre Entwicklung abgeschlossen haben, also alte und abgestorbene Zellen. Diese Zellen haben dann schon alle ihre Wirkungsmöglichkeiten geäußert, sie haben Ameisensäure gebildet, aber auch schon solche vergoren. In den nächsten Tagen in welchen die Hauptentwicklung vorüber ist, findet scheinbar ausschließlich Vergärung der Ameisensäure statt; aber auch in diesem Stadium sproßt die Hefe noch und bringt junge kräftige Zellen hervor. Es muß also auch jetzt noch Bildung von Ameisensäure eintreten. Aus dieser Überlegung geht also hervor, daß die gefundenen Zahlen Kompensationswerte sind, gebildet aus der Menge entstandener und vergorener Ameisensäure.

Nun findet aber scheinbar mitunter überhaupt keine Bildung von Ameisensäure statt, wie z. B. *Saccharomyces Pastorianus* III bei 27° (Tabelle 20 und 20a), hier wird nach 24 Stunden schon weniger Ameisensäure gefunden, als zugesetzt war. Daß aber auch hier tatsächlich Kompensationswerte vorliegen, geht daraus hervor, daß innerhalb des ersten und zweiten Tages, wenn die größte Menge Alkohol gebildet wird (siehe Tabelle 51 und 52), weniger Ameisensäure vergoren wird, als in den nächsten Tagen. Wird die ganze Entwicklung durch Herabsetzen der Temperatur auf 17° verlangsamt, so ist innerhalb des ersten Tages wieder ein Überschuß von Ameisensäure zu finden (Tabelle 23 und 24). Die ganzen in den ersten Tabellen gegebenen Zahlen sind also Minimalwerte; es wird mehr Ameisensäure gebildet und mehr

Ameisensäure vergoren, als die Zahlen angeben, beide Prozesse laufen nebeneinander her; die Ameisensäurebildung überwiegt in der ersten Zeit, wenn besonders viele junge gärkräftige Zellen vorhanden sind, und die Vergärung überwiegt, wenn die Entwicklung ihren Höhepunkt überschritten hat.

Es wurde früher schon auf die merkwürdige Tatsache aufmerksam gemacht, daß bei Zusatz von Ameisensäure mehr Ameisensäure vergoren wird, als ohne Zusatz, und daß in letzterem Falle mehr Ameisensäure gebildet wird. Auch ohne Zusatz von Ameisensäure findet eine nachweisbare Vergärung statt, denn nach 24 Stunden wird die größte Menge gefunden, später sinkt sie dann langsam ab.

Um zu sehen, ob diese Erscheinung auf eine erhebliche Schädigung des ganzen Gärungsprozesses durch die hinzugefügte Ameisensäure zurückzuführen ist, wurden die Mengen Alkohol bestimmt, welche, unter sonst gleichen Bedingungen, in Bierwürze allein und in Bierwürze + Natriumformiat gebildet werden. Die erhaltenen Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle Nr. 51.

Keine Ameisensäure bei 27°.

Nährlösung: Bierwürze. Hefeart: Sacch. Pastorianus III.

Zeit in Tagen	Gewicht von 50 ccm Destillat	Gewichts % Alkohol	Volum % Alkohol
1	49,8637	1,44	1,82
2	49,7781	2,43	3,07
3	49,7280	3,00	3,78
4	49,7204	3,06	3,85

Tabelle Nr. 51 a.

0,4601 g Ameisensäure als Natriumformiat bei 27°.

Nährlösung: Bierwürze. Hefeart: Sacch. Pastorianus III.

Zeit in Tagen	Gewicht von 40 ccm Destillat	Gewichts % Alkohol	Volum % Alkohol
1	49,9202	0,85	1,07
2	49,8170	1,99	2,51
3	49,7658	2,55	3,21
4	49,7633	2,60	3,28

Tabelle Nr. 52.

Keine Ameisensäure bei 27°.

Nährlösung: Bierwürze. Hefeart: Sacch. ellipsoideus II.

Zeit in Tagen	Gewicht von 50 ccm Destillat	Gewichts % Alkohol	Volum % Alkohol
1	49,7415	2,82	3,56
2	49,6322	4,11	5,18
3	49,6198	4,23	5,33
4	49,6135	4,29	5,40

Tabelle Nr. 52a.

0,4601 g Ameisensäure als Natriumformiat bei 27°.

Nährlösung: Bierwürze. Hefeart: Sacch. ellipsoideus II.

Zeit in Tagen	Gewicht von 50 ccm Destillat	Gewichts % Alkohol	Volum % Alkohol
1	49,7346	2,88	3,64
2	49,6618	3,75	4,75
3	49,6402	3,99	5,03
4	49,64	3,99	5,03

Wie aus den erhaltenen Resultaten hervorgeht, findet eine erhebliche Schädigung der Alkoholproduktion und damit des ganzen Gärungsprozesses durch die Anwesenheit größerer Mengen Ameisensäure nicht statt, es müssen also andere Gründe für diese Erscheinung vorhanden sein.

Sind schon von vornherein erhebliche Mengen Ameisensäure vorhanden, so scheint die Vergärungsfähigkeit der Hefe für diese Säure angeregt zu werden; eine gewisse Ameisensäurekonzentration scheint überhaupt vorhanden sein zu müssen, bevor sie angegriffen wird.

Soviel ist jedenfalls sicher, daß durch Hefen erhebliche Mengen Ameisensäure gebildet und auch vergoren werden können und daß diese Prozesse mit dem eigentlichen Zerfall des Zuckers in Alkohol und Kohlendioxyd im Zusammenhang stehen.

Es wurde nun weiterhin noch untersucht, ob es nicht gelingt, den Überschuß an vergorener Ameisensäure noch weiter zu steigern; dies erschien möglich, wenn den Hefen nicht freie Ameisensäure, sondern ein Ameisensäurederivat geboten wird. Den ganzen Zerfall des Zuckers unter dem Einfluß der Zymase hat man sich doch wohl so vorzustellen, daß er sich zunächst mit dem Ferment verbindet und daß nun der Zerfall, über welche Zwischenstufen es auch sei, immer in Verbindung mit dem Ferment oder den Fermenten vor sich geht. Es treten also dann die Zwischenprodukte garnicht in freiem Zustande auf, sondern immer nur als Derivate: auf diesen Punkt soll später noch eingegangen werden. Wenn nun die Fermente Eiweißkörper sind, so ist es vielleicht die Amidogruppe, welche den Angriffspunkt zur Bildung der Zwischenproduktsderivate gibt, und aus diesem Grunde wurde das Verhalten von Formylglycin gegenüber Hefe geprüft.

Das für die Versuche notwendige Formylglycin wurde nach der Vorschrift von E. Fischer und O. Warburg<sup>1)</sup> dargestellt. Zur Überführung in das Natriumsalz wurde das Formylglycin in wenig warmem Wasser gelöst, mit Natronlauge genau neutralisiert, auf dem Wasserbade bis zur Trockne eingedampft und der farblose Salzrückstand zweimal aus Wasser umkristallisiert. Die Analysen des Salzes deuteten auf neutrales Formylglycinnatrium + ein Wasser.

Da keine Erfahrungen darüber vorlagen, ob das Formylglycin sich durch Kochen mit verdünnter Phosphorsäure glatt

<sup>1)</sup> Ber., Bd. 39, I (1906), S. 187.

in Ameisensäure und Glycin spalten ließ, wurde in  $\frac{1}{100}$  Mol. des Salzes die Ameisensäure in der üblichen Weise nach der Destillation mit Wasserdampf unter Zusatz von Phosphorsäure bestimmt. Es ergab sich hierbei in zwei Bestimmungen ein Fehler von  $-4,83\%$  und dieser Minusfehler wurde bei den späteren Berechnungen der Analysen in Rücksicht gezogen. Die Versuche wurden mit Stellhefe Kleinlein und *Sacharomyces Pastorianus* III ausgeführt, gleichzeitig wurden Parallelbestimmungen mit der äquivalenten Menge Natriumformiat unternommen. Die erhaltenen Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle Nr. 53.

0,4601 g Ameisensäure als Natriumsalz des Formylglycins.  
Nährboden: Bierwürze. Hefeart: Stellhefe aus der Brauerei  
«Kleinlein» in Heidelberg.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	—	0,4776	103,80	+ 0,0175	+ 3,82
2	—	0,4742	103,72	+ 0,0171	+ 3,72
3	—	0,4724	102,67	+ 0,0123	+ 2,67
4	—	0,4694	102,00	+ 0,0093	+ 2,00
5	—	0,4689	101,91	+ 0,0088	+ 1,91

Tabelle Nr. 53a.

0,4601 g Ameisensäure als Natriumformiat bei  $27^{\circ}$ .  
Nährboden: Bierwürze. Hefeart: Stellhefe aus der Aktien-  
brauerei «Kleinlein» in Heidelberg.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7680	0,4660	101,27	+ 0,0059	+ 1,27
2	4,6788	0,4572	99,38	- 0,0029	- 0,62
3	4,6730	0,4567	99,26	- 0,0034	- 0,74
4	4,6572	0,4551	98,47	- 0,0050	- 1,53
5	4,6256	0,4520	98,25	- 0,0081	- 1,75

Tabelle Nr. 54.

0,4601 g Ameisensäure als Natriumsalz des Formylglycins.  
Nährboden: Bierwürze. Hefeart: Sacch. Pastorianus III.

Zeit in Tagen	Kolomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	—	0,4682	102,69	+ 0,0081	+ 2,69
2	—	0,4752	103,28	+ 0,0151	+ 2,38
3	—	0,4792	104,15	+ 0,0191	+ 4,15
4	—	0,4799	104,30	+ 0,0198	+ 4,30

Tabelle Nr. 54a.

0,4601 g Ameisensäure als Natriumformiat bei 27°.  
Nährboden: Bierwürze. Hefeart: Sacch. Pastorianus III.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7338	0,4626	100,57	+ 0,0015	+ 0,57
2	4,4963	0,4394	95,50	— 0,0207	— 4,50
3	4,3305	0,4232	91,98	— 0,0369	— 8,50
4	4,0011	0,3910	84,98	— 0,0691	— 15,02

Es zeigt sich, daß hier, im Gegensatz zu den Versuchen mit Natriumformiatzusatz, ein erheblicher Überschuß von Ameisensäure vorhanden ist. Eine Vergärung tritt nur bei Stellhefe Kleinlein nach dem ersten Tage ein, aber diese ist auch nur sehr schwach, ist aber in ihrer Größenordnung dieselbe wie bei Zusatz von Natriumformiat. Bei *Saccharomyces Pastorianus* III wird die Menge der gebildeten Ameisensäure von Tag zu Tag größer, während bei Zusatz von Natriumformiat eine sehr kräftige Vergärung einsetzt. Die mit Zusatz von Formylglycin erhaltenen Werte ähneln sehr denen, die ohne Zusatz von Ameisensäure erhalten wurden (Tabelle 51—52). Die Hefen arbeiten hier in derselben Weise wie ohne Anwesenheit von

Ameisensäure, und das kommt wohl daher, daß ihnen die Ameisensäure in einer ähnlichen Form geboten wird, wie sie auch bei der Gärung auftritt.

Um nun noch zu guter Letzt zu entscheiden, ob die Vergärung der Ameisensäure durch Hefe den sich in ihr abspielenden enzymatischen Prozessen angehört, wurden auch noch Versuche mit Preßsaft unternommen. Der Preßsaft wurde nach dem von E. Buchner angegebenen Verfahren aus Stellhefe Kleinlein hergestellt. Die Kolben wurden mit einer Lösung von  $\frac{1}{100}$  Mol. Natriumformiat in 75 ccm Wasser, 25 ccm Preßsaft und  $\frac{3}{4}$  ccm Toluol gefüllt und in Thermostaten von  $27^{\circ}$  gehalten. Alle 24 Stunden wurde ein Kolben herausgenommen und die Ameisensäure in der üblichen Weise bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle 55.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1			verunglückt		
2	4,6874	0,4581	90,57	— 0,0020	— 0,43
3	4,7100	0,4603	100,05	+ 0,0002	+ 0,05
4	4,7789	0,4670	101,50	+ 0,0069	+ 1,50
5	4,7875	0,4679	101,69	+ 0,0078	+ 1,69

Tabelle 56.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7031	0,4596	99,89	— 0,0005	— 0,11
2	4,6780	0,4572	99,34	— 0,0029	— 0,66
3	4,7006	0,4594	99,84	— 0,0007	— 0,16
4	4,7611	0,4653	101,13	+ 0,0052	— 1,13

Tabelle 57.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	4,7048	0,4598	99,93	— 0,0003	— 0,07
2	4,6823	0,4576	99,45	— 0,0025	— 0,55
3	4,6979	0,4591	99,78	— 0,0010	— 0,22
4	4,7702	0,4662	101,32	+ 0,0061	+ 1,32
5	4,7897	0,4681	101,73	+ 0,0080	+ 1,73

Wie aus den erhaltenen Zahlen hervorgeht, tritt hier nur innerhalb der ersten Tage eine schwache Vergärung von Ameisensäure ein, während an den folgenden Tagen ein allmählich immer größer werdender Überschuß auftritt. Ganz anders werden aber die Verhältnisse, wenn man nebenher noch eine richtige alkoholische Gärung laufen läßt, wie die folgenden Versuche beweisen. Die Kolben wurden mit 50 ccm Wasser, enthaltend  $\frac{1}{100}$  Molekül Natriumformiat, 25 ccm einer 40%igen Saccharose-lösung und 25 ccm Preßsaft versetzt und im Thermostaten bei 27° gehalten.

Tabelle 58.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	—	—	—	—	—
2	4,7121	0,4605	100,09	+ 0,0004	+ 0,09
3	4,6880	0,4581	99,57	— 0,0020	— 0,43
4	4,5602	0,4456	96,86	— 0,0145	— 3,14
5	4,5538	0,4450	96,71	— 0,0151	— 3,29

Tabelle 59.

Zeit in Tagen	Kalomel g	Noch vorhandene HCOOH g	Noch vorhandene HCOOH %	Vergoren HCOOH g	Vergoren HCOOH %
1	—	—	—	—	—
2	4,7190	0,4611	100,23	+ 0,0010	+ 0,23
3	4,7327	0,4625	100,52	+ 0,0024	+ 0,52
4	4,6190	0,4514	98,12	0,0087	— 1,88
5	4,5403	0,4438	96,46	0,0163	— 3,54

Hier tritt, nachdem zunächst eine schwache Bildung von Ameisensäure eingesetzt hat, eine recht kräftige Vergärung ein, welche am fünften Tage den Betrag von 3,54% der zugesetzten Menge erreicht. Die Vergärung der Ameisensäure gehört also jedenfalls auch zu den in der Hefe verlaufenden enzymatischen Prozessen. Diese Zahlen beweisen auch noch, daß die Vergärung der Ameisensäure durch Zucker in engem Zusammenhange mit dem Zerfall des Zuckers in Alkohol und Kohlendioxyd steht.

Ob nun die Substanz, welche die Vergärung der Ameisensäure bewirkt, mit den Substanzen identisch ist, die auch die Vorstufen des Alkohols und des Kohlendioxyds aus dem Zucker bilden und die von Buchner mit dem Gesamtnamen Zymase bezeichnet werden, kann sicher nicht entschieden werden. Wenn sich in der Buchnerschen Zymase aber eine Reihe von einzelnen Fermenten verbergen, die nacheinander in Wirksamkeit treten und die einzelnen Produkte des Zuckerzerfalls bilden, was sehr wahrscheinlich ist, so wird einer dieser Körper ein solcher sein, der die Spaltung der Ameisensäure in Wasserstoff und Kohlendioxyd bewirkt, und dieser Körper wäre dann mit dem Namen Formiase zu bezeichnen. Solche Formiasen sind jedenfalls in der Mikroorganismenwelt außerordentlich verbreitet, auch Schimmelpilze und Bakterien vermögen Ameisensäure teilweise in sehr kräftiger Weise zu verarbeiten.<sup>1)</sup> Da die Ameisensäure ein im Pflanzenreich außerordentlich verbreiteter Körper

<sup>1)</sup> Siehe die früheren Abhandlungen.

ist, werden auch in den höheren Pflanzen derartige Formiasen vorkommen, und es liegt deshalb der Verdacht nahe, daß diejenigen Fermente, welche eine Reduktion bewirken, die sogenannte Reduktasen, zum Teil weiter nichts sind als Formiasen. Durch die Formiasen wird eine Spaltung der Ameisensäure in Wasserstoff und Kohlendioxyd bewirkt und der Wasserstoff im status nascens übt dann die Reduktionswirkungen aus.

Wie dem nun aber auch sei, sicher geht jedenfalls soviel aus den angestellten Versuchen hervor, daß durch Hefe Ameisensäure gebildet und auch Ameisensäure vergoren wird, daß diese Prozesse enzymatische Prozesse sind und in engem Zusammenhange mit dem eigentlichen Zerfall des Zuckers in Alkohol und Kohlendioxyd stehen.

Wenn auch nachgewiesen worden ist, daß das eine Spaltungsstück des Schadeschen Milchsäurezerfalls, die Ameisensäure, von Hefen vergoren wird, so muß, wenn diese Theorie als richtig anerkannt werden soll, auch das andere Spaltungsstück, der Acetaldehyd, von Hefen vergoren werden. Diesbezügliche Versuche sind neuerdings von Buchner und Meisenheimer<sup>1)</sup> angestellt worden. Sie benützten für ihre Untersuchungen nicht den freien Acetaldehyd, sondern Äthylidenoxyformiat, das Ameisensäurehalbacetalanhydrid. In diesem Körper werden der Hefe gleichzeitig beide Spaltungsstücke der Milchsäure geboten. Versuche mit Preßsaft verliefen jedoch negativ. Wir haben einige Versuche mit freiem Acetaldehyd angestellt und die Konzentrationen ermittelt, in denen er entwicklungs-hemmend wirkt, um zu sehen, ob die Hefen überhaupt erhebliche Mengen Acetaldehyd vertragen können. Die Kolben, in denen sich Würze als Nährboden befand, wurden in der üblichen Weise mit der Hefe besät,  $\frac{1}{100}$ ,  $\frac{1}{200}$ ,  $\frac{1}{400}$ ,  $\frac{1}{800}$  und  $\frac{1}{1000}$  Molekül Acetaldehyd hinzugegeben und 5 Tage in einen Thermostaten von 17° eingestellt und nach dieser Zeit die Entwicklung beobachtet; bei *Saccharomyces Pastorianus* III und *ellipsoideus* I wurde auch noch das Erntegewicht bestimmt.

<sup>1)</sup> Ber., Bd. 42 (1910), S. 1782.

Die Hefe wurde auf dem Goochtiiegel abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und so lange in den Vakuumexsikkator gestellt, bis Gewichtskonstanz eingetreten war. Die erhaltenen Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle Nr. 60.

Hefeentwicklung in Bierwürze bei Zugabe von Acetaldehyd.  
Nach 5 Tagen bei 17°.

		$1/100$ g M.	$1/200$ g M.	$1/400$ g M.	$1/800$ g M.	$1/1000$ g M.
Sacch. ellipsoideus I	Erntegewicht	keine Entwickl. —	keine Entwickl. —	starke Entwickl. 0,2005	s. starke Entwickl. 0,2624	s. starke Entwickl. 0,2402
Sacch. Pastorian. III	Erntegewicht	keine Entwickl. —	keine Entwickl. —	keine Entwickl. —	starke Entwickl. 0,2343	starke Entwickl. 0,2348
Torula pulcherrima	Erntegewicht	keine Entwickl.	keine Entwickl.	starke Entwickl.	starke Entwickl.	starke Entwickl.
nicht bestimmt						
Sacch. cerevisiae	Erntegewicht	keine Entwickl.	keine Entwickl.	s. schwache Entwickl.	starke Entwickl.	starke Entwickl.
nicht bestimmt						

Konzentrationen von  $1/200$  Molekül Acetaldehyd wirken auf alle Arten wachstumshindernd ein, bei *Saccharomyces Pastorianus* III auch noch  $1/400$  Molekül. Wenn nun Acetaldehyd tatsächlich als Zwischenprodukt bei der Zuckerspaltung auftritt, so darf er sich jedenfalls nicht anhäufen, um nicht entwicklungshemmend zu wirken. Wie spätere Überlegungen zeigen sollen, ist es überhaupt nicht wahrscheinlich, daß Acetaldehyd als solcher bei der Zuckerspaltung auftritt, sondern in Form von Derivaten, die keine schädlichen Wirkungen mehr ausüben brauchen. Die Vergärungsversuche mit Acetaldehyd und Acetaldehydderivaten sollen später wieder aufgenommen werden.

Wenn nun auch der Nachweis, daß Ameisensäure durch Hefe vergoren wird, eine starke Stütze für die Wohl-Schadesche Spaltungstheorie ist, so lassen doch neuerliche Untersuchungen von Buchner und Meisenheimer<sup>1)</sup> wieder Zweifel an dieser Hypothese aufkommen. Buchner und Meisenheimer untersuchten die verschiedenen Zwischenprodukte, welche das Wohl-Schadesche Spaltungsschema voraussehen läßt, auf ihre Fähigkeit, durch Hefe vergoren zu werden und untersuchten auch, ob diese Zwischenkörper sich eventuell in gärenden Flüssigkeiten nachweisen lassen. Sie fanden, daß Milchsäure weder von Hefen vergoren wird, noch in gärenden Flüssigkeiten vorkommt. Dasselbe fanden sie vom Methylglyoxal; dagegen wird Glycerinaldehyd in erheblichem Maße von Preßsaft vergoren, jedoch absolut nicht vollständig; Dioxyaceton dagegen, welches das Wohl-Schadesche Schema nicht vorsieht, wird von Hefe mit annähernd derselben Intensität angegriffen wie Traubenzucker. P. Boysen-Jensen<sup>2)</sup> will ja auch das Dioxyaceton als Produkt der alkoholischen Gärung aufgefunden haben; jedoch bedarf diese Angabe noch der Nachprüfung. Buchner und Meisenheimer glauben deshalb, daß das Dioxyaceton als Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung aufzufassen ist: über den weiteren Zerfall dieses Körpers in Alkohol und Kohlendioxyd sprechen sie sich aber nicht aus.

Kann man sich nun mit der Annahme von Dioxyaceton als Zwischenprodukt eine plausible strukturechemische Vorstellung von der weiteren Bildung des Alkohols und des Kohlendioxyds machen?

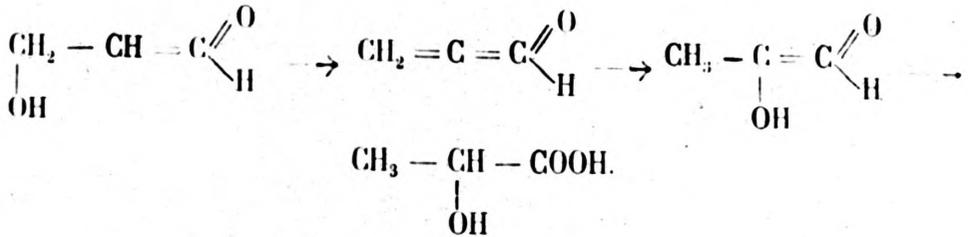
Man kann sich vorstellen, daß das Dioxyaceton zunächst unter Wasserabspaltung in seine Glykolform übergeht, daß diese dann ein Molekül Wasser abspaltet unter Bildung eines dreiwertigen ungesättigten Alkohols; unter nochmaliger Abspaltung von Wasser entsteht ein zweiwertiger Alkohol mit 2 doppelten Bindungen, und dieser lagert sich in den Malonsäuredialdehyd um.

<sup>1)</sup> Ber., Bd. 43 (1910), S. 1773.

<sup>2)</sup> Ber. d. Deutsch. botan. Ges., Bd. 26a (1908), S. 666.

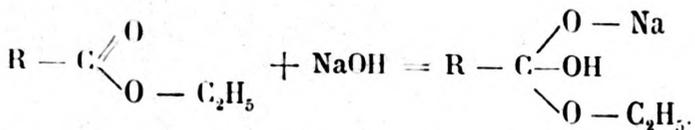


worden ist; auch für die Ameisensäure ist in diesem Schema kein Platz. Die Bildung von  $\alpha$ -Milchsäure könnte man sich allerdings vorstellen, wenn man annimmt, daß der  $\beta$ -Oxyakrylaldehyd noch einmal Wasser abspaltet, einen Aldehyd mit zwei doppelten Bindungen bildet, daß sich wieder Wasser anlagert, wobei  $\alpha$ -Oxyakrylaldehyd entsteht, und daß dieser unter Anlagerung von Wasser in  $\alpha$ -Milchsäure übergeht.

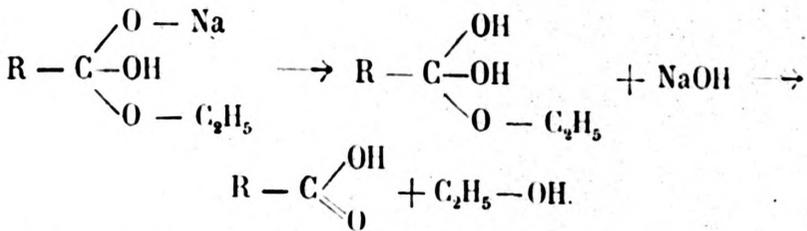


Diese Vorstellungen sind also alle recht unbefriedigend; viel annehmbarer ist vom strukturehemischen Standpunkt aus das Wohl-Schadesche Spaltungsschema, welches ja auch schon im Laboratoriumsversuch, ohne Zuhilfenahme von Mikroorganismen, durchgeführt worden ist. Es müssen deshalb die Buchner-Meisenheimerschen Befunde, an denen gewiß nicht zu zweifeln ist, mit diesem Spaltungsschema in Übereinstimmung gebracht werden, was eventuell durch folgende Überlegung geschehen kann.

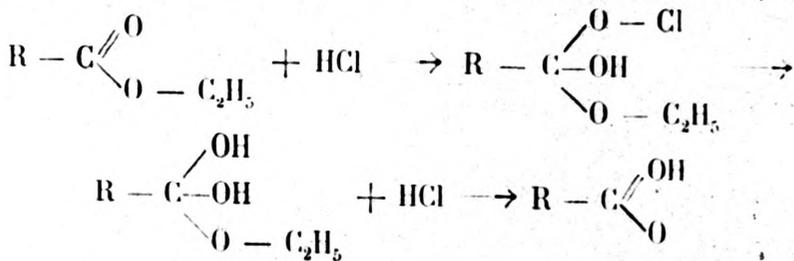
Betrachtet man einen auch durch Fermente zu bewirkenden Vorgang, z. B. die Verseifung eines Esters, so läßt sich dieser Vorgang, wenn die Verseifung durch Natronlauge ausgeführt wird, am besten in folgender Weise vorstellen. Es findet zunächst eine Anlagerung von Natronlauge an den Ester statt; die doppelte Bindung zwischen Kohlenstoff und Sauerstoff wird aufgerichtet und es bildet sich das Natriumsalz eines Orthosäureesters



Dieses Salz zerfällt nun unter Wasseraufnahme in Natronlauge und den sauren Orthoester selbst, welcher dann unter Abspaltung von Äthylalkohol in die freie Säure übergeht.



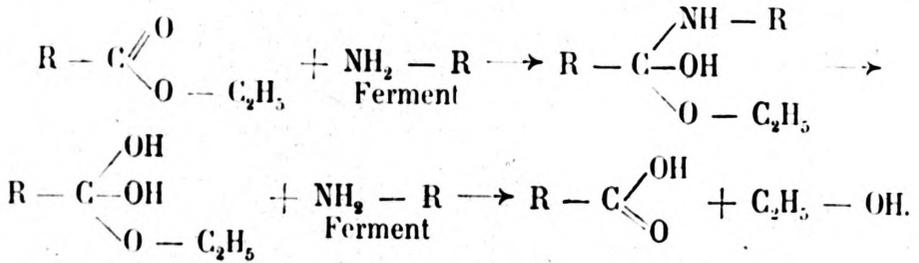
Bei der Verseifung durch Natron hört der Prozeß nun auf, sobald es durch die freiwerdende Säure verbraucht ist. Anders liegt die Sache bei der Anwendung von Säuren als verseifenden Mitteln; hier kann man mit einer verhältnismäßig geringen Menge Säure eine große Menge Ester spalten, weshalb dieser Vorgang mit der fermentativen Verseifung eine größere Ähnlichkeit besitzt. Hier erfolgt, wenn man Salzsäure als verseifendes Mittel anwendet, zunächst die Bildung des Chlorides, des Orthosäureesters, dieser zerfällt in Salzsäure und den Orthosäureester, welcher dann unter Abspaltung von Alkohol in die Säure übergeht. Auch die Esterbildung unter dem Ein-



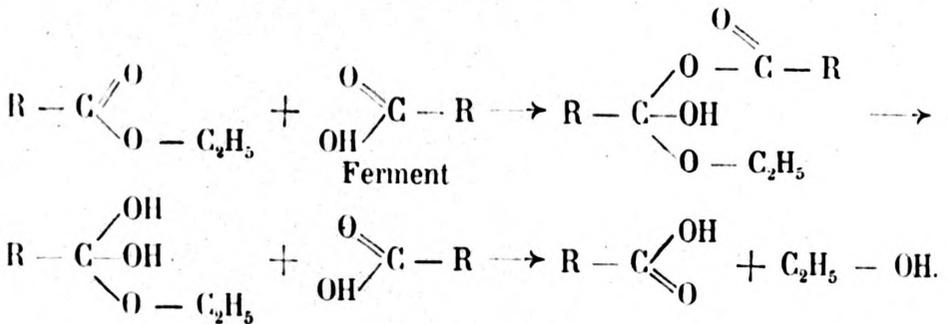
fluß von Säure kann man sich in ganz analoger Weise vorstellen; ob die Reaktion nun in der einen oder anderen Richtung verläuft, hängt von der Menge der reagierenden Substanzen ab. Das Wesentliche bei dieser Auffassung der Verseifung ist also die Anlagerung des verseifenden Mittels, die Spaltung erfolgt dann spontan.

Ähnlich hat man sich die Esterspaltung durch lipolytische Fermente vorzustellen. Die Fermente sind jedenfalls zum größten Teil Eiweißkörper oder eiweißähnliche Körper: als reaktive Gruppen kommen entweder die Amidgruppen oder die Carboxylgruppen in Betracht. Wenn man die Amidgruppe des lipolytischen Fermentes als reagierend bei der Verseifung ansieht, so würde man sich den Vorgang ungefähr in folgender Weise vorzustellen haben. Die Amidgruppe lagert sich an die Estergruppe an, unter Bildung eines Amids des Orthosäureesters:

dann erfolgt Zerfall in Ferment und Orthosäureester selbst, und letzterer bildet unter Abspaltung von Alkohol die freie Säure.



Ähnlich ist der Vorgang, wenn man sich die Carboxylgruppe als reagierende Gruppe vorstellt. Es findet zunächst wieder Anlagerung des Fermentes statt, wobei die Säuregruppe des Fermentes reagiert, unter Bildung eines Säurederivates des Orthosäureesters; dieser spaltet dann wieder das Ferment ab unter Bildung des Orthosäureesters, welcher unter Abspaltung von Alkohol die Säure bildet.



Daß solche angenommenen Säurederivate überhaupt existenzfähig sind, geht aus dem Vorkommen von Acetylderivaten der Essigsäure hervor.<sup>1)</sup>

Auch andere Fermentreaktionen, z. B. Spaltung von Polypeptiden, von Glukosiden und von Polysacchariden, bei denen es sich ja jedenfalls um die Lösung einer Sauerstoff-Kohlenstoffbindung handelt, kann man sich in ähnlicher Weise vorstellen.

Bei dieser Auffassung der Fermentreaktionen ist also die Anlagerung des spaltenden Mittels die Hauptsache, die Spaltung selbst erfolgt dann spontan.

Auch die Wirkung der eigentlichen Gärungsenzyme, die

<sup>1)</sup> Hartwig Franzen, «Über einige Doppelverbindungen von Acetaten mit Essigsäureanhydrid». Ber., Bd. 41 (1908), S. 3641.

ja schließlich die Lösung einer Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung herbeiführen, kann ganz analog verlaufen. Man hat zunächst wieder die Anlagerung des Enzyms an die zu spaltende Substanz anzunehmen, wobei auch wohl hier wieder die Kohlenstoff-Sauerstoff-Doppelbindung der Punkt ist, an welchem der Angriff erfolgt. Wie die Reaktionen aber nun hier im einzelnen aufeinander folgen, soll nicht näher erörtert werden, es ist aber anzunehmen, daß hier nicht ein Ferment, sondern verschiedene Fermente, die mit Ferment 1, 2 und 3 bezeichnet werden sollen, in Reaktion treten, bis schließlich die sämtlichen OH-Gruppen durch Fermentmoleküle ersetzt oder mit ihnen belastet sind. Belastet mit diesen Fermentmolekülen werden die Übergänge der nach dem Wohl-Schadeschen Schema vorauszu sehenden Körper ineinander viel leichter erfolgen. Daß eine derartige Annahme zulässig ist, geht daraus hervor, daß die mit zwei Acetylgruppen belastete Weinsäure sich, nach den Untersuchungen von Wohl und Oesterlin<sup>1)</sup> schon bei ganz niedriger Temperatur in Oxalessigsäure überführen läßt, ein Vorgang, welcher der Entstehung der einzelnen Zwischenprodukte bei der alkoholischen Gärung vollkommen analog ist.

Da nach den Untersuchungen von Buchner und Meisenheimer Dioxyaceton in annähernd ebenso kräftiger Weise von Hefe angegriffen wird wie Glukose, während Glycerinaldehyd viel schwerer vergoren wird, so muß in dem Wohl-Schadeschen Schema vor den Glycerinaldehyd noch das Dioxyaceton eingeschoben werden. — Wie die Überführung der Glukose in das Dioxyaceton erfolgt, soll hier nicht näher erörtert werden. — Zunächst lagert sich an das Dioxyaceton ein Molekül Ferment 1 an. Belastet mit dem Ferment erfolgt zunächst der Übergang des Dioxyacetons in Glycerinaldehyd. Hierbei wird aber nicht das Ferment sofort wieder abgespalten und freier Glycerinaldehyd gebildet, sondern es entsteht ein Glycerinaldehydderivat des Fermentes 1. Zur Verwandlung des Glycerinaldehydes in Methylglyoxal ist ein Ferment 2 vorhanden: es lagert sich an das Ferment 1-Derivat des Glycerinaldehydes an, es erfolgt

<sup>1)</sup> Ber., Bd. 34 (1901), S. 1139.

Umlagerung und Bildung eines Methylglyoxalderivates von Ferment 1 und 2. Dann lagert sich ein Ferment 3 an und es erfolgt Umlagerung in ein Milchsäurederivat von Ferment 1, 2 und 3. Ist die Reaktion so weit gediehen, tritt Spaltung ein, aber auch nicht in freien Acetaldehyd und freie Ameisensäure, sondern in Fermentderivate dieser Körper, welche dann weiter miteinander reagieren, bis schließlich wieder die freien Fermente, Alkohol und Kohlendioxyd auftreten. Die Reaktionen können natürlich auch etwas anders erfolgen, z. B. auch nur mit einem Ferment, aber prinzipiell werden die Reaktionen wohl in der eben geschilderten Weise verlaufen.

Nun wirken die Fermente spezifisch, d. h. ein bestimmtes Ferment vermag nur einen bestimmten Körper oder eine bestimmte Konfiguration, auf die es eingestellt ist, anzugreifen. Es läßt sich nun sehr wohl vorstellen, daß das Ferment 2, welches den Übergang von Glycerinaldehyd in Methylglyoxal besorgt, gar nicht oder nur schwierig auf freien Glycerinaldehyd einwirkt, sondern daß diese Einwirkung nur auf das Ferment-1-Derivat des Glycerinaldehydes leicht erfolgen kann. Eine Einwirkung von Ferment 3, welches den Übergang in Milchsäure veranlaßt, auf freies Methylglyoxal tritt überhaupt nicht mehr ein: die Umlagerung kann nur mit dem Ferment-1-2-Derivat des Methylglyoxals erfolgen; ebenso wird freie Milchsäure nicht mehr angegriffen, sondern nur das Fermentderivat usw. Kurz an die freien Körper kann keine Anlagerung derjenigen Fermente, die den Körper aus ihren Vorstufen gebildet haben, mehr erfolgen, und es tritt deshalb auch keine weitere Umlagerung mehr ein. Aus diesem Grunde haben die Buchner und Meisenheimerschen Untersuchungen negative Resultate ergeben.

Aussicht darauf, auch die angenommenen Zwischenprodukte eventuell zur Vergärung zu bringen, wäre dann vorhanden, wenn man Derivate dieser Körper, speziell Aminosäurederivate, der Einwirkung von Hefe oder Preßsaft aussetzt; diesbezügliche Versuche sollen angestellt werden.

---