

## Über Alkoholgärung.

Von

S. Kostytschew.

### IV. Mitteilung.

#### Über Zuckerspaltung durch Dauerhefe in Gegenwart von Zinkchlorid.

Von

S. Kostytschew und A. Scheloumoff.

(Aus dem botan. Laboratorium der Frauenhochschule in St. Petersburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. Mai 1913.)

In den früher veröffentlichten Mitteilungen<sup>1)</sup> wurde dargetan, daß bei Zuckervergärung durch verschiedene Hefepräparate in Gegenwart von Zinkchlorid ziemlich beträchtliche Mengen von Acetaldehyd entstehen. Dies zeigt, daß Zinkchlorid die Tätigkeit der Gesamtheit der Hefefermente qualitativ verändert. Es ist also von großem Interesse, zu untersuchen, ob der Zuckerabbau durch  $ZnCl_2$  in gleichem Maße gehemmt wird, wie die Bildung der Endprodukte der alkoholischen Gärung und ob das Verhältnis  $CO_2$ : Alkohol in Gegenwart von Zinkchlorid unverändert bleibt.

Abgesehen davon, daß hier der erste Fall einer durch äußere Einflüsse hervorgerufenen qualitativen Veränderung der Fermentwirkungen vorliegt, gewährt die nähere Untersuchung der Einwirkung von  $ZnCl_2$  noch aus folgendem Grunde Interesse. Die Hauptschwierigkeit bei der Untersuchung des Mechanismus der alkoholischen Gärung besteht darin, daß die Bildung der Endprodukte bei Zymasegärung erstaunlich glatt quantitativ

<sup>1)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 130 (1912); S. Kostytschew und E. Hübbsenet, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 359 (1912); S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 93 (1913).

erfolgt: wie bekannt, wird die «Gärprobe» in einigen Fällen für die Zuckerbestimmung auf Grund der bei der Gärung entwickelten  $\text{CO}_2$ -Menge verwendet. Dieser Umstand ist um so merkwürdiger, als auch nach Abtötung des lebenden Plasmas die Zuckerspaltung bei Anwendung genügender Zymasemenge schließlich nur  $\text{CO}_2$  und Alkohol und zwar immer die gleichen Mengen der beiden Produkte liefert.<sup>1)</sup> Es unterliegt aber keinem Zweifel, daß die alkoholische Gärung keinen einheitlichen Vorgang vorstellt. Hieraus ist ersichtlich, daß die Korrelation der verschiedenen Fermentwirkungen im Vorgange der Zymasegärung eine sehr vollkommene ist.

Diese Erwägungen haben einen von uns veranlaßt, bei den Untersuchungen über alkoholische Gärung einen ganz neuen Weg einzuschlagen und durch künstliche Eingriffe die Bildung unveränderter oder nur wenig veränderter intermediärer Gärprodukte zu erzielen suchen. Durch Zusatz von  $\text{ZnCl}_2$  zu der gärenden Flüssigkeit wird nun in der Tat eine tiefgreifende Veränderung der Zuckerspaltung und Bildung von neuen Produkten hervorgerufen. Von diesen Produkten wurde in erster Linie Acetaldehyd isoliert. Weiterhin ergab es sich, daß Acetaldehyd durch Hefefermente zu Äthylalkohol reduziert werden kann. Es ist demnach die Voraussetzung am Platze, daß Acetaldehyd ein unverändertes intermediäres Produkt der Zuckervergärung vorstellt. Es scheint also, daß die Einwirkung von Zinkchlorid und anderen Stoffen auf die alkoholische Gärung von großem Nutzen sein kann bei den Untersuchungen über den Mechanismus der Gärung.

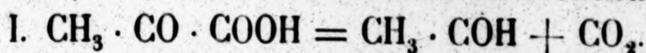
Das vorläufig nur als eine Arbeitshypothese vorgeschlagene Schema von S. Kostytschew<sup>2)</sup> nimmt an, daß Kohlendioxyd und Äthylalkohol im Vorgange der Zymasegärung nicht ganz gleichzeitig entstehen. Zunächst findet die Bildung von Acet-

---

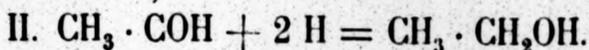
<sup>1)</sup> E. Buchner weist darauf hin (Zymasegärung, S. 214 (1903), daß bei der Gärung von Preßsaft etwa 15% des Zuckers in die Endprodukte der Gärung nicht übergehen. Einer von uns hat sich davon vergewissert, daß diese Regel für Dauerhefe (Hefanol und Zymin) nur bei bestimmtem Verhältnis zwischen den Mengen von Hefe und Zucker zutrifft.

<sup>2)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschr., Bd. 79, S. 143 u. 361 (1912).

aldehyd und Kohlendioxyd statt durch Einwirkung der Carboxylase auf Ketosäuren, und zwar wahrscheinlich auf Brenztraubensäure.



Alsdann erfolgt eine Reduktion von Acetaldehyd zu Äthylalkohol durch den in früheren Phasen der Gärung entstandenen aktiven Wasserstoff.<sup>1)</sup>



Es ist tatsächlich gelungen, beide Reaktionen sowohl mittels lebender als mittels getöteter Hefe auszuführen. Die Bildung von Acetaldehyd aus Ketosäuren wurde von C. Neuberg und L. Karczag,<sup>2)</sup> die Reduktion von Acetaldehyd zu Äthylalkohol von S. Kostytschew und E. Hübbenet<sup>3)</sup> nachgewiesen.

Den wichtigsten Einwand gegen die soeben dargestellte Voraussetzung bildet die Tatsache, daß bei verschiedenen äußeren Einwirkungen in den bisher vorliegenden Untersuchungen verschiedener Forscher immer nur die Energie der Gärung herabgesetzt bzw. gesteigert war; in allen Fällen wurde aber

<sup>1)</sup> Nachdem dieses Schema in meiner III. Mitteilung (Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 101—102) wieder abgedruckt worden war, wies A. v. Lebedew (Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 308) darauf hin, daß er (Chem. Ber., Bd. 45, S. 3267; Bull. soc. chim. de France, Bd. 11—12, S. 1039; Biochem. Zeitschr., Bd. 46, S. 488) «schon früher» zu eben denselben Anschauungen gekommen sei, was meinerseits nicht erwähnt wurde. Dies geschah aber nur aus dem Grunde, daß es immer empfehlenswert ist, ein Original und nicht eine Kopie zu zitieren. In der III. Mitteilung habe ich mein ursprüngliches Schema der Reduktasewirkung ohne jede Änderung wiedergegeben; dieses Schema wurde bereits in zwei Mitteilungen (Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 143—144 und 360—361) veröffentlicht, bevor noch sämtliche Publikationen v. Lebedews, auf die er sich beruft, erschienen. Wenn also A. v. Lebedew schließlich zugibt, daß er genau dieselben Ansichten entwickelte, so liefert er hierdurch noch einen Beweis davon, daß sein Schema der Reduktasewirkung eine Wiederholung von meinem Schema ist, was übrigens aus dem Vergleich der einschlägigen Mitteilungen hervorgeht (vgl. S. Kostytschew, Chem. Berichte, Bd. 46, S. 339). So kann eine «Richtigstellung» den wahren Sachverhalt in unerwarteter Weise aufklären! (S. K.)

<sup>2)</sup> C. Neuberg und L. Karczag, Biochem. Zeitschrift, Bd. 36, S. 68 (1911).

<sup>3)</sup> S. Kostytschew und E. Hübbenet, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 359 (1912).

die Bildung gleicher Mengen von Kohlendioxyd und Alkohol verzeichnet. Aus den nachstehend beschriebenen Versuchen ist jedoch ersichtlich, daß in Gegenwart von Zinkchlorid das Verhältnis  $\text{CO}_2$  : Alkohol tatsächlich verändert wird in dem Sinne, der dem obigen Schema entspricht. Unsere Untersuchungen wurden teils mit Hefanol, teils mit «Trockenhefe nach v. Lebedew» ausgeführt. Die Zuckerbestimmungen haben wir zum größten Teil nach der zuverlässigen Methode von Lehmann<sup>1)</sup> ausgeführt. Außerdem kam in einigen Fällen die ausgezeichnete Methode von G. Bertrand<sup>2)</sup> in Anwendung. Beide Methoden ergaben bei gegenseitiger Kontrolle vollkommen übereinstimmende Resultate. Für physiologische Untersuchungen ist die Lehmannsche Methode deshalb sehr bequem, weil hierbei eine vorläufige Enteiweißung der Zuckerlösung nicht erforderlich ist, wie wir es wiederholt beobachtet haben. Eine unvollkommene Abscheidung von Kupferoxydul aus der Lösung könnte in der Tat keine Fehlerquelle einführen.

Für die Alkoholbestimmungen bedienen wir uns sowohl der pyknometrischen Methode als der von Nicloux<sup>3)</sup> empfohlenen Titration mit Kaliumbichromat in der Hitze in Gegenwart von Schwefelsäure. Dieses Verfahren ist namentlich für die Bestimmung geringer Alkoholmengen sehr praktisch. Die  $\text{CO}_2$ -Bestimmungen wurden meistens nach der Methode von Meissl<sup>4)</sup> vorgenommen. Behufs genauer Ermittlung des Verhältnisses  $\text{CO}_2$  : Alkohol wurden einige Versuche unter beständiger Luftdurchleitung ausgeführt. In diesem Falle verwendeten wir die  $\text{CO}_2$ -Bestimmung nach Pettenkofer.<sup>5)</sup> Als Antiseptikum diente in allen Versuchen Toluol.

---

<sup>1)</sup> F. Lehmann, «Über maßanalytische Methoden zur Bestimmung von Zuckerarten». Habilitationsschrift. Marburg, 1908.

<sup>2)</sup> G. Bertrand, *Bullet. de la soc. chimique*, Bd. 35, S. 1285 (1906).

<sup>3)</sup> Nicloux, *Bull. de la soc. chim.*, Bd. 35, S. 330 (1906); deutsche Beschreibung von H. Pringsheim im «Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden» von E. Abderhalden, Bd. 2, S. 7 (1910).

<sup>4)</sup> Vgl. «Zymasegärung», S. 80 (1903).

<sup>5)</sup> W. Palladin und S. Kostytschew, *Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden* von E. Abderhalden, Bd. 3, S. 480 (1910).

In der ersten Mitteilung<sup>1)</sup> wurde bereits hervorgehoben, daß Zinkchlorid die  $\text{CO}_2$ -Produktion von Hefanol außerordentlich stark hemmt. Da nun die Eiweißspaltung durch  $\text{ZnCl}_2$  nur ganz unwesentlich beeinflusst wird,<sup>2)</sup> so seien hier einige  $\text{CO}_2$ -Bestimmungen angegeben, welche die ganz spezifische Wirkung von Zinkchlorid auf den Gärungsvorgang illustrieren.

Sechs Gärkölbchen mit Meißlschem Verschuß. Ein jedes Kölbchen enthält 2 g Dauerhefe nach v. Lebedew, 2 g Traubenzucker, 10 ccm Wasser und 3 Tropfen Toluol. Die Kolben C, D, E und F enthielten außerdem je 0,07 g  $\text{ZnCl}_2$ .

Portionen	Kohlendioxyd in Grammen nach Stunden		
	4	24	48
A (Kontrolle) . . . .	0,34	0,94	0,96
B    >    . . . .	0,33	0,97	0,99
C (0,07 g $\text{ZnCl}_2$ ) . .	0,03	0,15	0,17
D    desgl.   . .	0,03	0,14	0,17
E    >    . .	0,02	0,15	0,17
F    >    . .	0,03	0,14	0,17

Parallel mit dieser starken Hemmung der  $\text{CO}_2$ -Produktion findet die Bildung von Acetaldehyd statt. Dieselbe erfolgt bei Zusatz von verschiedenartigen löslichen Zinksalzen und, obgleich in geringeren Mengen, bei Zusatz von einigen anderen anorganischen Verbindungen. Die ursprünglich angenommene Deutung des Mechanismus der Wirkung von  $\text{ZnCl}_2$ , wobei die Hauptrolle den polymerisierenden Eigenschaften dieser Verbindung zugeschrieben wurde, soll also modifiziert werden. Im folgenden Versuche wurde die Einwirkung verschiedener Zinksalze auf die Aldehydbildung untersucht. Die Reaktion von Rimini erlaubt, bei Anwendung ganz gleicher Mengen von Destillat, Nitroprussidnatriumlösung und Diäthylaminlösung, die Aldehydausbeuten nach der Intensität der entstandenen Färbung annähernd zu vergleichen.

8 Kolben mit je 10 g Dauerhefe, 10 g Rohrzucker, 50 ccm Wasser, 6 Tropfen Toluol und 0,02 Mol. verschiedener Zink-

<sup>1)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 134 (1912).

<sup>2)</sup> Vgl. die nachstehende V. Mitteilung.

salze. Versuchsdauer 6 Tage. Nach Ablauf dieser Zeit wurde ein jeder Kolben mit noch 50 ccm Wasser versetzt, davon je 15 ccm abdestilliert, und für die Reaktion von Rimini verwendet. Nach der Intensität der Reaktion tritt folgende Reihenfolge deutlich hervor.

Portion	Reaktion von Rimini
I. Ohne Zinksalz	äußerst schwach
II. Zinkphosphat	»
III. Zinkcarbonat	schwach (violett)
IV. Zinkacetat	mittelstark
V. Zinksulfat	stark
VI. Zinkchlorid	»
VII. Zinkbromid	sehr stark
VIII. Zinkjodid	»

Genau dieselbe Reihenfolge stellte sich heraus bei Anwendung der Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure. Bei Zusatz von Zinkcarbonat könnte selbstverständlich ein Teil des Salzes durch die bei der Gärung gebildeten Säuren zerlegt werden. Nun ist es nach dem Ergebnis von diesem Versuche sehr wahrscheinlich, daß namentlich Zinkionen die spezifische Wirkung auf den Gärungsvorgang ausüben.

In folgenden Versuchen haben wir die in Gegenwart von Zinkchlorid zerlegten Zuckermengen und die gebildeten Mengen von  $\text{CO}_2$  und Alkohol bestimmt. Für diese Versuche wurde Traubenzucker verwendet. Auf je 10 g «Trockenhefe» bezw. Hefanol haben wir immer 50 ccm Wasser und 0,5 ccm Toluol zugesetzt.

#### Versuche mit «Trockenhefe nach v. Lebedew».

Es kamen verschiedene käufliche Präparate von «Trockenhefe» in Anwendung. Aus diesem Grunde wurde unter gleichartigen Verhältnissen in einzelnen Fällen nicht immer die gleiche Energie der Gärung wahrgenommen. Das Wesen der Einwirkung von Zinkchlorid war aber immer dasselbe.

I. Serie. 0,15 g  $\text{ZnCl}_2$  auf je 10 g Hefe.

Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Nr. des Versuchs	Versuchsdauer in Tagen	Hefe in g	ZnCl <sub>2</sub> in g	CO <sub>2</sub> in g	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH in g	CO <sub>2</sub> / C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Zucker		
							Zugesetzt in g	Zerlegt im ganzen in g	Davon total vergoren in %
1	1	10	0,15	0,71	0,71	100 : 100	9,5	2,95	48
1	1	10	0	3,17	3,07	100 : 96	9,5	8,41	74
2	1	5	0,075	0,35	0,33	100 : 94	4,75	1,47	47
2	1	5	0	1,61	1,68	100 : 104	4,75	4,25	77
3	2	5	0,075	0,83	0,71	100 : 84	4,75	2,82	54
3	2	5	0	2,23	2,38	100 : 106	4,75	4,75	98
4	2	10	0,15	1,29	1,28	100 : 98	9,5	4,72	54
4	2	10	0,15	1,29	1,30	100 : 100	9,5	4,65	54
5	3	5	0,075	0,97	0,96	100 : 98	4,75	3,22	60
5	3	5	0	2,29	2,21	100 : 96	4,75	4,75	96
6	4	10	0,15	1,90	1,70	100 : 89	9,5	5,40	65
7	4	5	0	2,32	2,32	100 : 100	4,75	4,75	98
8	5	10	0,15	2,15	1,95	100 : 87	9,5	5,98	65
8	5	10	0,15	1,92	1,82	100 : 89	9,5	5,32	67

Aus diesen Zahlen ist folgendes ersichtlich.

Bei Abwesenheit von Zinkchlorid ist die Vergärung von Zucker durch die gleiche Menge von Trockenhefe nach 48 Stunden beendet. Das Verhältnis CO<sub>2</sub> : Alkohol entspricht immer genau der Gleichung der Alkoholgärung. Nach 24 Stunden sind etwa 25% des verschwundenen Zuckers nicht in die Endprodukte der Gärung übergegangen; wahrscheinlich findet hierbei die Bildung von Phosphorsäurezuckerester statt. Nach 48 Stunden ist jedoch der Zucker quantitativ zu CO<sub>2</sub> und Alkohol vergoren; die unbedeutenden Differenzen liegen innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler.

Ein ganz anderes Bild zeigt uns die Zuckervergärung in Gegenwart ganz geringer Mengen von Zinkchlorid. Hierbei wird nicht nur die Bildung der Endprodukte der Gärung, sondern auch die primäre Zuckerspaltung gehemmt, aber nicht in gleichem Maße. Die Zuckerspaltung erfolgt bedeutend schneller, als die Bildung von Kohlendioxyd und Alkohol; eine beträchtliche Menge von zerlegtem Zucker wird also zur Bildung anderer Stoffe

verwendet. Das Verhältnis  $\text{CO}_2$  : Alkohol entspricht während 48 Stunden der Gleichung der Alkoholgärung; später wird die  $\text{CO}_2$ -Produktion etwas größer, als die Alkoholbildung; da bei der  $\text{CO}_2$ -Bestimmung nach Meißl immer zu niedrige Zahlen erhalten werden, so sind die richtigen Werte von  $\text{CO}_2$  : Alkohol in den unter beständiger Luftdurchleitung ausgeführten Versuchen zu finden.

Es ergab sich also, daß ganz geringe Mengen von Zinkchlorid eine weitgehende Veränderung von Zuckerabbau hervorrufen.

## II. Serie. 0,3 g $\text{ZnCl}_2$ auf je 10 g Hefe.

Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Nr. der Versuche	Versuchsdauer in Tagen	Hefe in g	$\text{ZnCl}_2$ in g	$\text{CO}_2$ in g	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ in g	$\frac{\text{CO}_2}{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$	Zucker zugesetzt in g	Zucker zerlegt	
								Im ganzen in g	Davon total vergoren in %
9	2	10	0,3	0,77	0,74	100 : 96	8,5	2,36	64
10	2	10	0,3	0,84	0,90	100 : 107	4,75	2,48	70
10	2	10	0,3	0,80	0,85	100 : 106	4,75	2,43	68
11	4	10	0,3	0,89	0,82	100 : 94	8,5	3,13	54
11	4	10	0,3	0,84	0,79	100 : 96	8,5	3,54	45
12	4	10	0,3	0,88	0,83	100 : 97	8,0	3,21	57
13	4	10	0,3	1,06	0,92	100 : 87	9,5	3,57	56
13	4	10	0,3	1,05	1,00	100 : 95	9,5	3,57	57
14	4	10	0,3	1,56	1,61	100 : 103	4,75	3,75	85
15	4	10	0,3	1,38	1,38	100 : 100	4,75	3,45	81
15	4	10	0,3	1,17	1,23	100 : 104	4,75	3,17	76
16	6	10	0,3	1,43	1,38	100 : 96	4,75	3,45	81
16	6	10	0,3	1,26	1,18	100 : 94	4,75	3,01	82

Bei Zusatz von 0,3 g  $\text{ZnCl}_2$  wird sowohl die Zuckerspaltung, als die Bildung der Endprodukte der Gärung noch mehr verlangsamt, als bei Zusatz von 0,15 g  $\text{ZnCl}_2$ . Immer wird ein großer Teil des Zuckers nicht zu  $\text{CO}_2$  und Alkohol verarbeitet, sondern auf eine andere Weise gespalten. Merkwürdig

ist der Umstand, daß bei Vergärung geringer Zuckermengen die Energie der Zuckerverarbeitung im ganzen unverändert bleibt, aber die Menge des total zu  $\text{CO}_2$  und Alkohol vergorenen Zuckers erheblich zunimmt. In diesem Falle bleibt auch das Verhältnis  $\text{CO}_2$  : Alkohol dem theoretischen Werte sehr nahe. Im ganzen ist das Wesen der Einwirkung von Zinkchlorid eben dasselbe, wie in der vorstehenden Serie.

### III. Serie 0,6 g bzw. 1,2 g $\text{ZnCl}_2$ auf je 10 g Hefe.

Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Nr. der Versuche	Versuchsdauer in Tagen	Hefe in g	$\text{ZnCl}_2$ in g	$\text{CO}_2$ in g	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ in g	$\frac{\text{CO}_2}{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$	Zucker zugesetzt in g	Zucker zerlegt	
								im ganzen in g	Davon total vergoren in %
17	6	10	0,6	0,15	0,05	100 : 33	8,0	0,30	66
18	6	10	0,6	0,15	0,07	100 : 47	8,0	—	—
18	6	10	0,6	0,15	0,06	100 : 40	8,0	—	—
19	4	10	0,6	0,12	0,10	100 : 83	4,75	0,86	25
19	4	10	0,6	0,15	0,11	100 : 73	4,75	0,86	30
20	6	10	0,6	0,17	0,09	100 : 53	4,75	0,60	43
21	6	10	1,2	0,04	0	—	8,0	0	—
22	6	10	1,2	0,03	0	—	8,0	spur	—
23	4	10	1,2	0,02	0	—	4,75	0	—
23	4	10	1,2	0,02	0	—	4,75	0	—
24	6	10	1,2	0,02	0	—	4,75	spur	—

Diese Tabelle zeigt, daß größere Mengen von Zinkchlorid die Gärung außerordentlich stark hemmen. Bei Zusatz von 1,2 g  $\text{ZnCl}_2$  auf je 10 g Hefe wird der Zuckerabbau vollkommen eingestellt. Bei Zusatz von 0,6 g  $\text{ZnCl}_2$  wurde eine nennenswerte Zuckerspaltung nur bei geringer Zuckergabe (4,75 g auf je 10 g Hefe) wahrgenommen, wobei der größte Teil des verschwundenen Zuckers in die Endprodukte der Gärung nicht überging. Während in Gegenwart von 0,3 g  $\text{ZnCl}_2$  die Zymasegärung noch grammweise  $\text{CO}_2$  und Alkohol liefert, bringt die doppelte Menge von  $\text{ZnCl}_2$  den Gärungsvorgang beinahe voll-

kommen zum Stillstand. Es ist interessant, damit zu vergleichen, wie wenig der Eiweißabbau durch Zusatz von 0,6 g bzw. 1,2 g  $ZnCl_2$  auf je 10 g Hefe verändert wird.<sup>1)</sup> Hieraus ist einleuchtend, daß  $ZnCl_2$  eine direkte Wirkung auf die Gärungsfermente ausübt.

#### IV. Serie. Versuche mit Luftdurchleitung.

Diese Versuche hatten den Zweck, das Verhältnis  $CO_2 : C_2H_5OH$  in Gegenwart und bei Abwesenheit von Zinkchlorid genau zu ermitteln. Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle zusammengefaßt.

Nr. der Versuche	Versuchsdauer in Tagen	Hefe in g	$ZnCl_2$ in g	$CO_2$ in g	$C_2H_5OH$ in g	$\frac{CO_2}{C_2H_5OH}$	Zucker zugesetzt in g	Zucker zerlegt	
								Im ganzen in g	Davon total vergoren in %
25 a	6	10	0	3,892	3,917	100 : 100	8,0	7,94	99
25 b	6	10	0,3	0,974	0,767	100 : 78	8,0	2,01	86
25 c	6	10	0,6	0,057	0	—	8,0	0,33	—
26	4	5	0,15	1,326	1,102	100 : 83	4,75	3,00	76
27	6	5	0,15	1,132	0,868	100 : 77	4,75	2,39	84
28	6	5	0,15	1,196	1,019	100 : 85	2,37	2,20	100
29	6	5	0,3	0,795	0,706	100 : 89	2,37	1,56	96

Diese Versuche ergaben also vollkommen übereinstimmende Resultate, welche diejenigen der vorstehenden Serien im allgemeinen bestätigen. Bei Abwesenheit von Zinkchlorid wird der Zucker total zu  $CO_2$  und Alkohol vergoren: das Verhältnis  $CO_2$ : Alkohol entspricht der Gleichung der alkoholischen Gärung (Versuch 25 a). Bei Zusatz von 0,3 g  $ZnCl_2$  auf je 10 g Hefe wird der Gärungsvorgang nicht nur stark gehemmt, sondern auch qualitativ verändert (Versuch 25 b, 26, 27); von der Gesamtmenge des verschwundenen Zuckers können nur etwa 80% in den Endprodukten der Gärung wiedergefunden werden; das Verhältnis  $CO_2$ : Alkohol entspricht nicht der Gleichung der alkoholischen Gärung, was mit dem Schema von S. Kostytschew übereinstimmt. Von einem Verlust von Alkohol durch Verdunstung kann nicht die Rede sein, da hinter den

<sup>1)</sup> Vgl. die nachstehende Mitteilung.

Versuchskolben immer die mit Schlangenrohr versetzten und in Eiswasser versenkten Kühler eingeschaltet wurden; eine Prüfung dieser Vorrichtung ergab, daß auch sehr flüchtige Substanzen im Kühler total zurückgehalten werden. Die abnorme Größe von  $\text{CO}_2 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  deutet also unserer Meinung nach darauf hin, daß ein Teil des bei der Gärung intermediär gebildeten Acetaldehyds zu Äthylalkohol nicht reduziert wurde. In früher veröffentlichten Mitteilungen wurde auch immer bei Zusatz von etwa 0,3 g  $\text{ZnCl}_2$  auf je 10 g Hefe eine gute Ausbeute an Acetaldehyd erhalten. Auch bei konstanter Luftdurchleitung wurde die merkwürdige Tatsache wahrgenommen, daß bei geringer Zuckergabe der zerlegte Zucker total zu  $\text{CO}_2$  und Alkohol vergoren wird (Versuch 28), während bei größerer Zuckergabe in Gegenwart von derselben  $\text{ZnCl}_2$ -Menge mindestens 20% des Zuckers in andere, noch nicht identifizierte Stoffe übergehen.

#### V. Serie. Versuche mit Hefanol.

Alle Eigentümlichkeiten der Einwirkung von Zinkchlorid auf Zymasegärung treten in Versuchen mit getötetem Material (Hefanol) noch deutlicher hervor. Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle zusammengefaßt.

Nr. der Versuche	Versuchsdauer in Tagen	Hefanol in g	$\text{ZnCl}_2$ in g	$\text{CO}_2$ in g	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH}$ in g	$\text{CO}_2$ $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH}$	Zucker zugesetzt in g	Zucker zerlegt	
								Im ganzen in g	Davon total vergoren in %
30	2	10	0,3	0,36	0,36	100 : 100	9,5	1,76	41
30	2	10	0,3	0,36	0,37	100 : 102	9,5	1,76	41
31	2	10	0,3	0,37	0,37	100 : 100	9,5	2,02	37
32	4	10	0,3	0,65	0,65	100 : 100	9,5	2,71	48
32	4	10	0,3	0,65	0,66	100 : 101	9,5	2,86	46
33	4	10	0,3	0,56	0,51	100 : 91	9,5	2,18	49
33	4	10	0,3	0,57	0,58	100 : 102	9,5	2,20	51
34	6	10	0	3,86	3,88	100 : 100	9,5	9,31	83
34	6	10	0	3,88	3,79	100 : 98	9,5	9,31	84
35	6	10	0,3	0,60	0,43	100 : 71	9,5	2,34	44
35	6	10	0,3	0,62	0,48	100 : 77	9,5	2,37	46
36	6	10	0,3	0,626	0,379	100 : 60	9,5	1,72	58

Der Versuch 36 wurde bei konstanter Luftdurchleitung ausgeführt.

Bei Anwendung von Hefanol wird also in Gegenwart von Zinkchlorid nur die Hälfte des zerlegten Zuckers total zu  $\text{CO}_2$  und Alkohol vergoren, während bei Abwesenheit von  $\text{ZnCl}_2$  die Gesamtmenge des zugesetzten Zuckers zerlegt und davon 83% zu den Endprodukten der Gärung vergoren werden, wobei  $\text{CO}_2 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  der Gleichung der alkoholischen Gärung entspricht.

Ebenso wie bei «Trockenhefe» ist das Verhältnis  $\text{CO}_2 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  im Verlaufe der anfänglichen Tage der Gärung dem theoretischen Werte sehr nahe. Nach Ablauf von 6 Tagen ist aber eine beträchtliche Mehrproduktion von  $\text{CO}_2$  zu verzeichnen; in dem unter konstanter Luftdurchleitung ausgeführten Versuche ist  $\text{CO}_2 : \text{Alkohol}$  gleich 100 : 60, was bisher bei der Gärung von Dauerhefe noch niemals beobachtet worden war.

In der III. Mitteilung wurde bereits dargetan,<sup>1)</sup> daß bei Zusatz von Methylenblau zu der gärenden Flüssigkeit ebenfalls Acetaldehyd entsteht. Neuerdings hat S. Lvoff<sup>2)</sup> darüber berichtet, daß zwischen den Mengen von zugesetztem Methylenblau und von abgeschiedenem Kohlendioxyd ein bestimmtes Verhältnis besteht. In Übereinstimmung mit S. Kostytschew nimmt der Verfasser an, daß Methylenblau den bei der Gärung entstehenden aktiven Wasserstoff wegnimmt und hierdurch die Korrelation zwischen den einzelnen Phasen der Gärung zerstört. Auf Grund verschiedener Überlegungen neigt sich Verfasser zu der Voraussetzung, daß die Abspaltung und die nachfolgende Anlagerung von Wasserstoff nicht nur einmal (wie es in meinem kurzen Schema angegeben ist), sondern wiederholt erfolgt; demnach wird das Hexosemolekül noch in früheren Phasen «inaktiviert» und die Bildung der beiden Endprodukte der Gärung verhindert.

Dies ist in der Tat sehr wahrscheinlich und könnte am besten durch Ermittlung des Verhältnisses von Methylenblau zu dem nicht total vergorenen Zucker experimentell erläutert werden; doch sind derartige Versuche vom Verfasser nicht

<sup>1)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 102 (1913).

<sup>2)</sup> S. Lvoff, Botanische Berichte, Bd. 31, S. 141 (1913).

ausgeführt worden. Auch wir haben uns mit dieser Frage nicht befaßt; die nachstehenden Versuche, die noch vor dem Erscheinen der Lvoffschen Mitteilung vollendet waren, verfolgen nur den Zweck, die Einwirkung von Methyleneblau mit derjenigen von Zinkchlorid zu vergleichen. Diese Versuche sind von Frl. W. Brilliant ausgeführt, der wir dafür zu bestem Dank verpflichtet sind. Für die Zuckerbestimmungen wurde der Rückstand von der Alkoholdestillation durch Quecksilberchlorid von Methyleneblau befreit, filtriert und im Filtrat das überschüssige Quecksilber durch Natriumcarbonat ausgefällt. Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Nr. der Versuche	Versuchsdauer in Tagen	Hefe in g	Methyleneblau in g	CO <sub>2</sub> in g	Alkohol in g	CO <sub>2</sub> Alkohol	Zucker zugesetzt in g	Zucker zerlegt	
								Im ganzen in g	Davon total vergoren in %
37	5	5	0,5	1,16	1,17	100 : 101	4,75	3,51	66
38	5	5	0,5	1,14	1,07	100 : 94	4,75	—	—
39	5	5	0	2,31	2,36	100 : 102	4,75	4,75	98
40	5	5	0	2,32	2,41	100 : 104	4,75	4,75	100

Durch Zusatz von 1 g Methyleneblau auf je 10 g Hefe wird also die Energie der Gärung weniger herabgesetzt als durch Zusatz von 0,3 g Zinkchlorid. Methyleneblau bewirkt ebenfalls eine qualitative Veränderung von Zuckerabbau, da eine beträchtliche Menge des zerlegten Zuckers in die Endprodukte der Gärung nicht übergeht. Ein Unterschied von der Wirkung von Zinkchlorid besteht aber darin, daß bei Zusatz von Methyleneblau das Verhältnis CO<sub>2</sub> : Alkohol dem theoretischen Werte sehr nahe bleibt.

Wir glauben annehmen zu dürfen, daß die Methode der künstlichen qualitativen Veränderung der biochemischen Reaktionen durch Zinkchlorid, Methyleneblau und andere geeignete Stoffe große Dienste leisten kann bei der Aufklärung des Mechanismus von Zymasegärung und anderen physiologischen Vorgängen. Es ist von vornherein sehr wahrscheinlich, daß die «qualitative Veränderung» der Gesamtheit der Fermentwirkungen bei der alkoholischen Gärung nur auf die Störung der Korrelation von

verschiedenen einzelnen Phasen des Vorganges zurückzuführen ist: es wird ja gegenwärtig allgemein anerkannt, daß die Fermente nur die Geschwindigkeit der Reaktionen verändern. Von diesem Standpunkte aus wäre es kaum zulässig, anzunehmen, daß die Gärungsfermente in Gegenwart von  $ZnCl_2$  ihre Tätigkeit grundsätzlich verändern und den Zucker auf eine neue eigentümliche Weise zu spalten beginnen. Einfacher und wahrscheinlicher ist die Annahme, daß der nicht total zu  $CO_2$  und Alkohol vergorene Zucker in die intermediären Produkte der Gärung überging. Dies gibt uns also ein Mittel, die Isolierung der intermediären Produkte der biologischen Reaktionen zu erleichtern. Früher mußte man es sich gefallen lassen, die durch zufällige Störungen des Gärungsvorganges entstehenden ganz geringen Mengen der Zwischenprodukte zu erkennen zu suchen; jetzt werden wir hoffentlich imstande sein, eine künstliche Anhäufung der intermediären Gärungsprodukte hervorzurufen. Auch bei der Untersuchung von anderen biochemischen Reaktionen wird man wahrscheinlich auf analoge Weise vorgehen können.

Überblicken wir die erhaltenen gut übereinstimmenden Resultate, so können wir die Einwirkung von Zinkchlorid auf Zymasegärung folgendermaßen präzisieren.

1. Die Energie der Gärung wird stark herabgesetzt.
  2. Ein großer Teil von zerlegtem Zucker wird nicht zu  $CO_2$  und Alkohol vergoren, während bei Abwesenheit von Zinkchlorid die Bildung von Endprodukten der Gärung aus Zucker glatt quantitativ stattfindet.
  3. Nach einigen Tagen wird auch das Verhältnis  $CO_2$ : Alkohol verändert. Dies deutet darauf hin, daß die beiden Endprodukte der Gärung nicht ganz gleichzeitig entstehen. Alkohol wird wahrscheinlich zum Teil durch Acetaldehyd ersetzt, der ja in Gegenwart von Zinkchlorid in beträchtlicher Menge entsteht.
-