

Über die Bildung von Milchsäure bei der alkoholischen Gärung.

Von

Max Oppenheimer.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Der Redaktion zugegangen am 9. Dezember 1913.)

Der normale Weg des Zuckerabbaus bei der alkoholischen Gärung führt zu Alkohol und Kohlensäure als Endprodukten. Daneben entstehen, wie man weiß, außer Bernsteinsäure und Fuselölen hauptsächlich zwei Verbindungen, über deren Bildung und Rolle bei der alkoholischen Gärung trotz zahlreicher Untersuchungen bis heute noch keine volle Klarheit herrscht. Es sind dies die Milchsäure und das Glycerin.

Von der Milchsäure glaubte man lange, daß sie ein auf dem Hauptwege des Zuckerabbaus liegendes, intermediäres Produkt der alkoholischen Gärung sei. Ihr häufig beobachtetes Auftreten bei alkoholischen Gärungen, ihre leichte Bildung bei der Milchsäuregärung, welche eventuell als Vorstufe der alkoholischen Gärung betrachtet werden konnte, die so glatt erfolgende Bildung der Milchsäure aus Hexosen unter dem Einfluß chemischer Agentien, dazu ihr Auftreten im tierischen Organismus ließen diese Anschauung als äußerst verlockend erscheinen. Obwohl bereits im Jahre 1858 Pasteur zeigte, daß bei bakterienfreier Gärung durch lebende Hefe niemals Milchsäure auftritt, waren deshalb die Theorien zahlreich, welche die reguläre Bildung von Milchsäure als intermediäres Produkt wahrscheinlich machen und erklären wollten. In den letzten Jahren waren es insbesondere Buchner und Meisenheimer,¹⁾ welche in mehreren Arbeiten die Frage der Milch-

¹⁾ E. Buchner und J. Meisenheimer, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 37, S. 417 (1904); Bd. 38, S. 620 (1905); Bd. 39, S. 3201 (1906). — Thiels, Landw. Jahrb., Bd. 38, Erg.-Bd. 5, S. 272 (1909); Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 43, S. 1773 (1910).

säurebildung bei der alkoholischen Gärung des Zuckers untersuchten.

So konnten diese Autoren bei zellfreier Gärung des Zuckers mehrfach die Bildung von Milchsäure feststellen, in anderen Fällen dagegen verschwand sogar zugesetzte Milchsäure. Für diese auffallende Tatsache konnten sie jedoch keine befriedigende Erklärung finden. Weder ließ sich ein Zusammenhang zwischen vergorenem Zucker und verschwundener resp. gebildeter Milchsäure feststellen, noch gelang der Nachweis, daß nach beendeter Gärung verschwundene Milchsäure wirklich vergoren war.

Nachdem es Buchner und Meisenheimer so nicht gelungen war, mit Hilfe der zellfreien Gärung zu entscheiden, ob die Milchsäure als Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung zu betrachten sei, suchten sie diese Frage auf anderem Wege zu lösen. Sie gingen dabei von der Erwägung aus, daß bei der alkoholischen Gärung mit lebender Hefe ein Zwischenprodukt des Zuckerabbaus doch gelegentlich einmal aufgefunden werden müsse, unter Umständen auch selbst durch lebende Hefe vergoren werden sollte. Nachdem aber die bereits oben erwähnte Pasteursche Feststellung, daß bei Gärung mit reiner Hefe niemals Milchsäure unter den Gärprodukten aufzufinden war, durch Kontrollversuche bestätigt worden war, prüften Buchner und Meisenheimer das Verhalten der Milchsäure gegenüber lebender Hefe. Ihre Versuche führten sie zu dem übereinstimmenden Resultate, daß Milchsäure von lebender Hefe weder vergoren noch gebildet wird.

Da auch Slator¹⁾ gefunden hatte, daß die Milchsäure durch Hefe nicht oder nur sehr langsam und unvollständig vergoren wird, kommen Buchner und Meisenheimer ebenso wie Slator zu dem Schlusse, daß nach diesen Ergebnissen die Annahme von Milchsäure als Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung nicht mehr begründet sei.

Schon Slator schloß aus seinen Ergebnissen, daß Milchsäure wahrscheinlich ein Nebenprodukt der alkoholischen Gärung sei, und Buchner und Meisenheimer sprachen die

¹⁾ A. Slator, Journ. Chem. Soc., Bd. 89, S. 141 (1906), Bd. 93, S. 231 (1908); Ber. der Dtsch. chem. Ges., Bd. 40, S. 213 (1907).

Ansicht aus, daß das Auftreten von Milchsäure bei der zellfreien Gärung durch Umlagerung eines als Vorstufe der Milchsäure anzusehenden Zwischenproduktes der alkoholischen Gärung verständlich werden könne. Als solche Zwischenprodukte zogen sie Methylglyoxal, Glycerinaldehyd und Dioxyaceton in Erwägung und stellten gleichzeitig die Forderung auf, daß ein Körper, welcher als Zwischenprodukt zu betrachten sei, entweder möglichst selbst bei der alkoholischen Gärung nachgewiesen werden, oder wenigstens durch lebende Hefe oder durch Hefepreßsaft vergärbar sein müsse, eine Forderung, die auch neuerdings C. Neuberg¹⁾ ausdrücklich für ein Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung erhebt.

Nun hatten bereits P. Mayer²⁾ und A. Wohl³⁾ gefunden, daß Methylglyoxal von lebender Hefe nicht vergoren wird. Bei Wiederholung dieser Versuche, sowie bei Versuchen mit Hefepreßsaft hatten Buchner und Meisenheimer ebenfalls ein vollkommen negatives Ergebnis und kamen deshalb zu dem Schlusse, daß Methylglyoxal aus der Reihe der möglichen Zwischenprodukte ausscheiden müsse, wodurch es dann auch als Vorstufe der Milchsäure ausgeschlossen wurde.

Trotz dieser negativen Befunde hat neuerdings C. Neuberg (l. c., S. 4 ff.) auf Grund von theoretischen Erwägungen, vor allen wegen seiner Beziehungen zur Brenztraubensäure, Methylglyoxal wieder als Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung herangezogen. Die mangelnde Gärfähigkeit suchte er durch die Annahme zu begründen, daß es für physiologisches Geschehen einen großen Unterschied bedeute, ob ein Stoff zugesetzt wird oder von Natur an richtiger Stelle und jeweils in geeigneter Menge entsteht (l. c., S. 14).

Eine solche Möglichkeit ist natürlich bedingungslos anzuerkennen; daraus aber eine allgemeine biologische Gesetzmäßigkeit herzuleiten, dürfte denn doch zu weit gegangen sein. Logischerweise müßte dasselbe Gesetz dann auch u. a. für

¹⁾ C. Neuberg, Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle, Jena 1913, S. 6.

²⁾ P. Mayer, Biochem. Zeitschr., Bd. 2, S. 435 (1906).

³⁾ A. Wohl, Biochem. Zeitschr., Bd. 5, S. 59 (1907).

die Milchsäure in Anspruch genommen werden, welche doch gerade auch wegen ihrer mangelnden Gärungsfähigkeit aus der Reihe der möglichen Zwischenprodukte bei der alkoholischen Gärung ausgeschaltet wurde. Jedenfalls widerspricht die Neubergsche Begründung seinen eigenen bereits erwähnten Forderungen, die an ein Zwischenprodukt zu stellen sind.

Freilich glauben v. Lebedew und Griaznoff¹⁾ nach orientierenden Versuchen eine Vergärbarkeit des Methylglyoxals annehmen zu dürfen, aber der angekündigte ausführliche Bericht ist inzwischen noch nicht erfolgt.

Der einzige positive Befund, der eventuell dafür sprechen würde, daß das Methylglyoxal auch bei der alkoholischen Gärung eine Rolle spielen könnte, sind zwei vereinzelte Versuche Neubergs,²⁾ welche bei obergäriger lebender Hefe und bei Macerationssaft derselben obergärigen Hefe eine recht starke Milchsäurebildung ergaben. Der Lebedewsche Macerationssaft mit untergäriger Hefe gab jedoch keine nachweisbare Milchsäurebildung. Bevor also nicht weitere experimentelle Tatsachen vorliegen, wird man die Annahme von Methylglyoxal als Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung als noch nicht genügend begründet betrachten müssen.

Es kamen also für Buchner und Meisenheimer nur noch Dioxyaceton und Glycerinaldehyd in Frage. Beim Glycerinaldehyd konnten die Autoren eine, wenn auch langsame und unvollständige, so doch deutliche Vergärbarkeit (etwa 10—25%) nachweisen, bei Dioxyaceton gelang es ihnen, in Bestätigung früherer Versuche von Bertrand³⁾ unter entsprechenden Versuchsbedingungen mit Preßsaft eine Vergärung von 80—90% der angewandten Substanz herbeizuführen.

Buchner und Meisenheimer kamen daher zu dem Schlusse, daß «die im Vergleiche mit dem Verhalten der beiden anderen Vorstufen der Milchsäure außerordentlich große Gärfähigkeit des Dioxyacetons, welche in einigen Versuchen direkt

¹⁾ A. v. Lebedew und N. Griaznoff, Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 45, S. 3268, Anmerkung (1912). — Vgl. auch A. v. Lebedew, Biochem. Zeitschr., Bd. 46, S. 483 (1912).

²⁾ C. Neuberg, Biochem. Zeitschr., Bd. 51, S. 484 (1913).

³⁾ G. Bertrand, Ann. chim. phys. [8], Bd. 3, S. 256 (1904).

der des Traubenzuckers gleichkam, die hypothetische Annahme der intermediären Bildung dieses Körpers als die geeignetste erscheinen lasse, um den Mechanismus des Zuckerzerfalls zu erklären». Der symmetrische Aufbau des Dioxyacetons würde nach Buchner und Meisenheimer auch leicht verständlich machen, daß uns bei der zellfreien Gärung der verschiedenen Zuckerarten immer die racemische Form der Milchsäure begegnet.

v. Lebedew und Griaznoff (l. c.) zeigten dann, daß der Glycerinaldehyd durch den Hefemacerationssaft bei 1%iger Konzentration ebenso gut wie Saccharose vergoren wird, nur langsamer. Dagegen fehlt dem Glycerinaldehyd die Fähigkeit des Dioxyacetons, bei der Vergärung einen Zuckerester zu bilden, sodaß v. Lebedew zu der Aufstellung eines Gärungsschemas kam, bei welchem Zucker nach vorherigem Übergang in eine Ketohexose zunächst in je ein Molekül Glycerinaldehyd und Dioxyaceton zerfällt, worauf der Glycerinaldehyd vergoren, Dioxyaceton verestert wird. Welche der beiden Substanzen die wahrscheinliche Vorstufe der Milchsäure ist, kommt hierbei jedoch nicht zum Ausdruck.

Die Untersuchungen von Embden, Baldes und Schmitz¹⁾ über den Chemismus der Milchsäurebildung aus Traubenzucker im Tierkörper haben weiter gezeigt, daß Glycerinaldehyd in weitaus höherem Maße als Dioxyaceton von Blutkörperchen allein und auch in der durchbluteten Leber in Milchsäure übergeführt wird, und überhaupt unter den gewählten Versuchsbedingungen für die tierischen Gewebe weit angreifbarer ist, als Dioxyaceton. Die genannten Autoren fassen ihre Ergebnisse in folgenden Schlußsätzen zusammen:

«Wir möchten auf Grund unserer Erfahrungen glauben, daß als Zwischenprodukt bei dem zu optisch aktiver Milchsäure führenden Traubenzuckerabbau im tierischen Organismus praktisch weitaus an erster Stelle optisch aktiver Glycerinaldehyd in Betracht kommt. Im Zusammenhalt mit den Ergebnissen von Buchner und Meisenheimer liegt es nahe, ganz allgemein als Muttersubstanz der d-Milchsäure optisch aktiven

¹⁾ Embden, Baldes und Schmitz, Biochem. Zeitschr., Bd. 45, S. 108 (1912).

Glycerinaldehyd, als Muttersubstanz der d-l-Milchsäure Dioxyaceton anzunehmen.»

Hierbei weisen die Autoren allerdings ausdrücklich auf die Möglichkeit des Übergangs von Glycerinaldehyd in Dioxyaceton und umgekehrt hin.

Der von Embden, Baldes und Schmitz entwickelten Anschauung haben Embden und der Verfasser¹⁾ in einer darauffolgenden Abhandlung als einer Vermutung²⁾ nochmals Ausdruck gegeben und ausdrücklich betont, daß die angeschnittene Frage noch der experimentellen Prüfung bedürfe.

Die so überaus leicht erfolgende chemische Umlagerung von Glycerinaldehyd und Dioxyaceton zu Milchsäure durch verdünnte Natronlauge konnte bereits früher durch eigene Versuche³⁾ dargetan werden.

Außer den besprochenen Verbindungen konnte unter Umständen auch noch eine weitere 3-Kohlenstoffverbindung als Quelle der Milchsäure bei der alkoholischen Gärung in Betracht kommen, nämlich Brenztraubensäure. Für den Tierkörper hatte bereits früher P. Mayer⁴⁾ bei innerer Darreichung und neuerdings G. Embden in Gemeinschaft mit dem Verfasser⁵⁾ bei Durchblutung der überlebenden Leber nachgewiesen, daß Brenztraubensäure durch einfache Reduktion in Milchsäure übergehen kann. Auf Grund des Mayerschen Befundes hatten deshalb auch schon v. Lebedew und Griaznoff⁶⁾ die Bildung von Milchsäure aus Brenztraubensäure bei der Gärung in Erwägung gezogen. Neben Glycerinaldehyd und Dioxyaceton wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit auch diese Substanz auf ihr Verhalten gegen Hefesaft in bezug auf Milchsäurebildung geprüft.

¹⁾ G. Embden und Max Oppenheimer, Biochem. Zeitschrift, Bd. 45, S. 206 (1912).

²⁾ Anmerkung: Von einer «Behauptung», wie solche Neuberg (l. c., S. 23, Anm.) den Autoren unterstellt, war an keiner Stelle die Rede.

³⁾ Max Oppenheimer, Biochem. Zeitschr., Bd. 45, S. 134 (1912).

⁴⁾ P. Mayer, Biochem. Zeitschr., Bd. 40, S. 441 (1912).

⁵⁾ G. Embden und Max Oppenheimer, Biochem. Zeitschrift, Bd. 55, S. 335 (1913).

⁶⁾ l. c., S. 3268.

Unter Berücksichtigung der im voranstehenden angeführten bisherigen Ergebnisse und der noch bestehenden experimentellen Lücken ergab sich für die vorliegenden Untersuchungen folgende Fragestellung:

Tritt Gärungsmilchsäure nur bei bakterieller Gärung, also in Anwesenheit von spezifischen Milchsäurebakterien auf, oder kann ihre Bildung tatsächlich auch eine Nebenreaktion der alkoholischen Gärung sein, eine Wirkung eines der als «Zymase» zusammengefaßten Gärungsenzyme bei Ausschluß von Bakterien? Wenn dann im Gegensatz zur Gärung mit lebender Hefe bei Preßsaft resp. bei Macerationssaft, auch unter vollkommenem Ausschluß von Bakterien, Milchsäure auftritt, wenn auch, wie bei Buchner und Meisenheimer, in schwankenden Mengen, wie läßt sich dieser Widerspruch erklären und vor allem, welches sind die Vorstufen der gebildeten Milchsäure?

Methodik.

Für die Versuche wurde ausschließlich Hefemacerationssaft verwendet, der im wesentlichen nach den Angaben v. Lebedew¹⁾ hergestellt wurde. Einige kleine Modifikationen waren durch die Notwendigkeit eines möglichst sterilen Arbeitens bedingt. Die von der Firma Schröder in München bezogene Trockenhefe wurde in sterilen 1 Liter-Pulverflaschen in Portionen von je 60 g mit 180 g Wasser zu einem gleichmäßigen Brei angerührt und 3 Stunden in einem Wasserbade von 35° erwärmt, wobei, jedenfalls infolge Selbstgärung, fast stets sehr starke Schaumbildung eintrat, die den ursprünglichen Inhalt bis zum mehrfachen Volumen steigen ließ, so daß oft die ganze Literflasche mit Schaum erfüllt war. Nach kurzem Stehen, unter wiederholtem Umschütteln zur möglichsten Beseitigung des Schaumes, wurde der Inhalt der Ansätze in einer großen Zentrifuge mit 4000 Umdrehungen pro Minute, ca. 1/2 Stunde zentrifugiert und dann unter Verwendung steriler Apparatur filtriert. Der so erhaltene Hefesaft wurde in den meisten Fällen sofort zum Versuche verwendet, einigemal über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Die Ansätze erfolgten in sterilisierten

¹⁾ A. v. Lebedew, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 447 (1911).

300 ccm-Erlenmeyer-Kolben, welche mit einem mit Schwefelsäure gefüllten Sicherheitsaufsatze verschlossen waren.

Mit Ausnahme des ersten orientierenden Versuches wurden jeweils gleichzeitig 5 Ansätze mit 50 ccm Hefesaft gemacht, ein Ansatz A zur Bestimmung des Milchsäuregehaltes des Hefesaftes vor dem Versuche, ein zweiter Ansatz B für Bestimmung der Milchsäure nach dem Versuche ohne Zusatz zum Hefesaft, und drei Ansätze T, G und D zur Bestimmung der Milchsäure nach dem Versuche bei Zusatz von jeweils gleichen Mengen, und zwar je 1%, Traubenzucker, Glycerinaldehyd und Dioxyaceton.

Bei den Versuchen mit Brenztraubensäure wurden außer den beiden Leerversuchen A und B noch zwei Ansätze gemacht, der eine mit Traubenzucker zum Vergleiche, und der andere mit Brenztraubensäure, resp. der auf 1% Säure umgerechneten Lösung des Natriumsalzes, welche durch Neutralisation der Säure mit der berechneten Menge 33%iger Natronlauge unter guter Kühlung hergestellt wurde.

Als Antiseptikum wurden verwandt 1—2%, in einem Falle versehentlich sogar 10% Toluol. In einigen Fällen wurde noch zur Bindung der Milchsäure und zur Vermeidung eventueller Enzymschädigung durch dieselbe je 1% kohlenaurer Kalk hinzugefügt.

Die Erlenmeyer-Kolben blieben dann zwischen drei Stunden, der kürzesten Versuchsdauer, und vier Tagen, dem längsten Versuche, im Dunkeln bei Zimmertemperatur stehen. Fast sämtliche Versuche fielen in die Wintermonate, in welchen die Temperatur des Raumes durchschnittlich 21° betrug.

Nach beendeter Reaktion wurde der Kolbeninhalt mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und dann nach Schenck¹⁾ mit je dem doppelten Volumen Salzsäure und Sublimatlösung enteweißt, die Filtrate in der üblichen Weise weiter verarbeitet und in aliquoten gemessenen Teilen nach der Extraktion im Lindschen Apparate die Milchsäure nach der verbesserten Überführungsmethode von v. Fürth-Charnass,¹⁾ wie solche im hiesigen Institute ausgeübt wird, bestimmt.

¹⁾ Abderhalden, Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden. Bd. 5, S. 1254 (1912).

Das bei der Extraktion ohne Enteiweißung so überaus lästige Schäumen der Flüssigkeit wurde hierbei fast gänzlich vermieden. In einigen Fällen, namentlich bei dem sofort und ohne Zusatz gefällten Hefesaft ließ sich das Schenck-Filtrat nicht vollständig entquecksilbern. Es bildeten sich mehr oder weniger kolloidale Lösungen, die aber nach dem Filtrieren ohne weiteres ausgeäthert werden konnten. Bei eventuellem Schäumen wurde die Rührung des Extraktionsapparates abgestellt und dafür doppelte Zeit extrahiert. Kontrollversuche bestätigten die hinlängliche Genauigkeit der Methode, bei welcher im Durchschnitt 95,6% der zugesetzten Milchsäure wiedergefunden wurden.

Über die für Milchsäurebestimmungen bei Versuchen mit Brenztraubensäure bedingten Modifikationen wurde bereits früher¹⁾ berichtet; es sei deshalb auf die in der betreffenden Arbeit mitgeteilte Methodik verwiesen.

Ein besonderer Wert wurde auf die genaue bakteriologische Kontrolle der Versuche gelegt.²⁾ Sowohl der Hefesaft vor, als auch die Ansätze nach dem Versuche wurden auf milchsäurebildende Bakterien geprüft. Von der zu untersuchenden Lösung wurden einige Ösen auf mit Kreide versetzte Maische-Agar-Patten³⁾ gebracht und die Schalen zwei Tage in den Brutschrank bei 35° gestellt. Hatten sich Bakterienkolonien gebildet, so wurde von denselben auf etwa 10 ccm Hefewasser abgeimpft unter Zusatz von 0,5 g Traubenzucker und 0,5 g Kreide und die Reagenzgläser wiederum zwei Tage bei 35° in den Brutschrank gebracht. Alsdann wurde abfiltriert und nach der Fletcher-Hopkinsschen Methode auf Milchsäure geprüft. Ein negativer Ausfall der Reaktion zeugte für die Abwesenheit von Milchsäurebakterien. Daß unter genügend aseptischen Kautelen gearbeitet wurde, dafür

¹⁾ G. Embden und Max Oppenheimer, Biochem. Zeitschrift, Bd. 55, S. 335 (1913).

²⁾ Herrn Dr. F. Silberstein sei für seine freundliche Unterstützung, bei Ausführung der bakteriologischen Arbeiten auch an dieser Stelle bestens gedankt.

³⁾ Vgl. W. Henneberg, Gärungsbakteriol. Praktikum, Berlin 1909 S. 45.

spricht der Umstand, daß nur ein Versuch wegen Verdachts der Infektion ausgeschieden werden mußte, während die übrigen Ansätze nach dem Versuche alle frei von Milchsäurebakterien waren, und nur bei einigen wenigen der Hefesaft vor dem Versuche einen schwach positiven Befund ergab, wodurch wiederum bewiesen wird, daß die Toluolzusätze für die Entwicklungshemmung eventueller Milchsäurebakterien genügten. Dazu kommt die schon von Buchner konstatierte¹⁾ bakterienhemmende Wirkung von Hefesaft als solchem und die sicher an und für sich schon bakteriziden Eigenschaften der Zusätze, welche namentlich für den Glycerinaldehyd in seinem Verhalten gegen *Bac. Delbrücki* aus noch unveröffentlichten Versuchen im hiesigen Institute hervorzugehen scheinen.

Versuchsergebnisse.

Die Ergebnisse der vergleichenden Versuche mit Hefesaft unter Zusatz von Traubenzucker, Glycerinaldehyd und Dioxyaceton sind in der nebenstehenden Tabelle I niedergelegt. Aus Kolonne 8 geht zunächst hervor, daß bei allen zehn ausgeführten Versuchen der Hefesaft präformierte Milchsäure enthielt und zwar zwischen 0,114 und 0,220 g pro 100 ccm, im Durchschnitt 0,1719 g. Soweit sich überhaupt Preßsaft mit Macerationssaft vergleichen läßt, stimmt dieser Befund mit den Angaben von Buchner und Meisenheimer überein, welche im frischen Hefepreßsaft bis zu 0,2% Milchsäure fanden.

Kolonne 9 zeigt, daß auch ohne Zusatz von Substanz zum Hefesaft mit Ausnahme des ganz kurzen 3-Stundenversuches (Vers. 8) beim Stehen Milchsäure gebildet wird, wenn auch in kleinen Mengen. Über die Quelle dieser Milchsäure läßt sich nichts mit Bestimmtheit aussagen, wenngleich es wohl als sicher angesehen werden darf, daß sie im wesentlichen in den Kohlenhydraten der Trockenhefe zu suchen ist.

In Kolonne 10 ist die bei Traubenzuckerzusatz gefundene Menge Milchsäure aufgeführt. Wiederum mit Ausnahme des 3-Stundenversuches zeigt sich hier eine Steigerung der Milchsäurebildung, ein Verschwinden der Milchsäure während

¹⁾ Buchner-Hahn, Zymasegärung, 1903, S. 112.

Tabelle I.

1 Ver- suchs- Nr.	2 Datum des Ver- suchs	3 Dauer des Ver- suchs	4 Zusatz von		7 Tem- pera- tur	8 A vor dem Ver- such	9 Gefundene Menge Milchsäure pro 100 ccm Hefesaft in g			12 Dioxy- aceton	13 Trauben- zucker T—B g	14 Glycerin- aldehyd G—B g	15 Dioxy- aceton D—B g	16 Gärkraft des Hefesaftes nach Buchner
			Sub- stanz	Kreide			B nachdem Versuch ohne Zusatz	T nach dem Versuch bei Zusatz von Trauben- zucker	G					
1	1912 26./XI.	4 Tage	10	1	—	0,1855	0,2643	0,3856	—	—	0,1213	—	—	—
2	2./XII.	4	1	10	Zim-	0,2115	0,2722	0,3833	0,3780	0,3735	0,1111	0,1058	0,1013	1,9800
3	10./XII.	4	1	1	—	0,1980	0,2810	0,3240	0,3345	0,3493	0,0430	0,0535	0,0683	2,1268
4	1913 7./I.	1 Tag	1	1	1	0,2175	0,3120	0,3105	0,3930	0,3165	0,0000	0,0810	0,0045	1,9154
5	17./I.	1	1	2	1	0,2205	0,2895	0,4080	0,4035	0,4065	0,1185	0,1140	0,1170	1,8278
6	23./I.	2 Tage	1	2	1	0,1305	0,1785	0,2040	0,4080	0,1995	0,0255	0,2295	0,0210	2,1778
7	28./I.	2	1	2	1	0,1282	0,1927	0,2422	0,2805	0,2197	0,0495	0,0878	0,0270	2,2282
8	8./II.	3 Std.	1	2	1	0,1140	0,1117	0,1080	0,1545	0,1125	0,0000	0,0428	0,0008	0,9564
9	4./III.	6	1	1	—	0,1590	0,1905	0,2130	0,2100	0,2074	0,0225	0,0195	0,0169	1,1302
10	4./IV.	6	1	1	—	0,1545	0,1710	0,1882	0,1935	0,1845	0,0172	0,0225	0,0135	2,1674

der Gärung, wie dies von Buchner und Meisenheimer konstatiert wurde, konnte in keinem Falle beobachtet werden.

Kolonnen 11 und 12 zeigen endlich die gefundenen Mengen Milchsäure bei Zusatz von Glycerinaldehyd und Dioxyaceton mit dem Ergebnis, daß sowohl Glycerinaldehyd wie Dioxyaceton im Hefesaft überaus starke Milchsäurebildner sind. In fast allen Fällen war die Bildung von Milchsäure stärker wie bei Traubenzucker, teilweise sogar erheblich stärker; bei geringerer Bildung lag dieselbe wohl ausnahmslos innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung.

Die überhaupt neugebildete, also aus den Zusätzen stammende Menge Milchsäure zeigt Kolonnen 13—15, welche die Differenz zwischen der Gesamtmenge Milchsäure und der nach dem Versuch ohne Zusatz vorhandenen Milchsäure B auführt.

In Kolonne 16 ist schließlich die Gärkraft der verwandten Hefesäfte aufgeführt; im übrigen sei auf die detaillierte Tabelle und die Besprechung der Ergebnisse der Gärkraftbestimmungen in der folgenden Abhandlung verwiesen.

Wir kommen zur Besprechung der einzelnen Versuche. Am wenigsten sagen die beiden viertägigen Versuche 2 und 3. Wohl zeigen sie bereits eindeutig das große Milchsäurebildungsvermögen sowohl von Glycerinaldehyd wie von Dioxyaceton, aber über den Grad der Angreifbarkeit beider Substanzen sagen sie nichts aus. Es scheint, als ob anfängliche Unterschiede sich nach dieser Zeit bereits verwischt hätten und ein Ausgleich eingetreten wäre. Um so deutlicher spricht der folgende Versuch 4, bei welchem die Versuchsdauer auf 1 Tag beschränkt wurde. Während bei diesem Versuche Traubenzucker keinerlei Milchsäure gebildet hatte und Dioxyaceton nur Spuren einer Vermehrung zeigte, wurden aus Glycerinaldehyd nicht unbedeutliche Mengen Milchsäure gebildet, 8,1% der zugesetzten Substanz. Versuch 5 zeigt wiederum ohne individuelle Unterschiede eine gleichmäßige erhebliche Milchsäurebildung aus allen drei zugesetzten Substanzen zwischen 11,4 und 11,85% des Zusatzes. Besondere Beachtung verdient dagegen wiederum Versuch 6. Dieser Versuch zeigt bei Glycerinaldehyd die

absolut stärkste Neubildung an Milchsäure: 0,2295 g auf 100 ccm Saft resp. 1 g zugesetzten Glycerinaldehyd, also fast 23% der zugesetzten Substanz waren der Gärung entzogen und in Milchsäure umgewandelt worden! Der Versuch gewinnt noch an Bedeutung durch die gleichzeitige Beobachtung, daß zwar die Gesamtgärkraft des angewandten Hefesaftes eine sehr gute war (2,1778), daß aber die Angärung überaus langsam erfolgte, so daß man von einer anfänglichen Gärungshemmung sprechen kann: nach 24 Stunden waren erst 0,0814 g CO_2 gebildet, nach 48 Stunden 0,3011 g, also ganz erheblich weniger als unter normalen Verhältnissen. Über den Zusammenhang zwischen Gärkraft und Milchsäurebildung wird später noch zu reden sein.

Auch Versuch 7 ergibt ein ähnliches Resultat, wenn auch lange nicht in so ausgesprochenem Maße. Auch hier ist die Bildung von Milchsäure aus Glycerinaldehyd ganz erheblich höher wie bei den anderen zugesetzten Substanzen, ebenso entspricht einer sehr guten Gärkraft (2,2282) wiederum eine ganz abnorme Gärverzögerung (0,0178 g CO_2 nach 24 Stunden und erst 0,0552 g CO_2 nach 48 Stunden).

Die relativ größte Zunahme an Milchsäure zeigt der zugleich kürzeste Versuch 8. Innerhalb 3 Stunden wurde hier aus Glycerinaldehyd, als aus der einzigen der zugesetzten Substanzen, die für die Kürze der Zeit nicht unbeträchtliche Menge von 0,0428 g Milchsäure gebildet. (Die Spur Milchsäure aus Dioxyaceton bei diesem Versuche liegt innerhalb der Fehlergrenze.) Ein Zusammenhang mit der vergleichsweise geringen Gärkraft des angewandten Hefesaftes (0,9564, die geringste überhaupt beobachtete Gärkraft) und der zugleich schwachen Angärung (nur 0,2857 g CO_2 innerhalb der ersten 24 Stunden) ist auch hier offensichtlich vorhanden.

Versuch 9 zeigt bei sechsständigem Stehen zwar eine, wenn auch innerhalb der Fehlergrenze liegende, geringe Mehrbildung von Milchsäure aus Zucker, als aus Glycerinaldehyd, welche aber wiederum, wenn auch unerheblich, stärker ist, als diejenige aus Dioxyaceton.

Versuch 10 schließlich zeigt wieder eine sehr ausge-

sprochene Bildung von Milchsäure innerhalb 6 Stunden, die bei Glycerinaldehyd fast doppelt so stark ist als bei Dioxyaceton.

Versuch 11. Zur Identifizierung der bei der Gärung mit Hefemacerationssaft erhaltenen Milchsäure wurde noch ein größerer Ansatz gemacht und zwar unter Zusatz von Glycerinaldehyd, der nach den vorhergehenden Erfahrungen ja als stärkster Milchsäurebildner anzusprechen war.

300 ccm Hefesaft wurden mit 3 g Glycerinaldehyd und 3 g Kreide unter Zusatz von 6 ccm Toluol in einem mit Sicherheitsaufsatz versehenen sterilen 1 Liter-Erlenmeyer-Kolben 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann nach Schenck gefällt. Vom Schenck-Filtrate wurden nach dem Entquecksilbern 1350 ccm, entsprechend 225 ccm Hefesaft resp. 2,25 g Glycerinaldehyd auf Zinklactat weiter verarbeitet. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser und unter Waschung mit 75%igem Alkohol betrug die Ausbeute an Zinklactat 1,45 g, entsprechend 0,94 g Milchsäure resp. 0,4177 g berechnet auf 100 ccm Hefesaft. Die Gesamtgärkraft des Saftes war 2,5091, die Gärkraft nach 24 Stunden 0,1241.

Die erhaltene Menge Milchsäure ist eine maximale und übertrifft noch die des Versuches 6. Auch hier ist die hohe Gesamtgärkraft des verwandten Hefesaftes bemerkenswert, der nur eine recht schwache Anfangsgärung gegenübersteht.

Für die Analyse wurde das Zinklactat, dessen Lösung optisch vollkommen inaktiv war, nochmals aus Wasser umkrystallisiert.

0,2382 g Substanz verloren 0,0424 g H_2O .
 $(C_3H_5O_3)_2Zn + 3H_2O$. Berechnet H_2O : 18,18%
 Gefunden > : 17,80%.

0,1959 g Substanz gaben 0,0650 g ZnO .
 $(C_3H_5O_3)_2Zn$. Berechnet ZnO : 33,19%
 Gefunden > : 33,40%.

Ein anderes Bild zeigen die Versuche mit Brenztraubensäure, deren Ergebnis aus der Tabelle II ersichtlich ist. Zwar nahm bei allen drei angestellten Versuchen die Milchsäurebildung sowohl beim Leerversuch wie beim Zusatz von Traubenzucker den typischen, oben geschilderten Verlauf. Dagegen wurde bei Zusatz von Brenztraubensäure in Form ihres

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ver- suchs- Nr.	Datum des Versuchs	Dauer des Versuchs	Zusatz von		Tem- pera- tur des Ver- suchs	Gefundene Menge Milchsäure pro 100 ccm Hefesaft in g			Ver- schwundene Menge Milchsäure pro 100 ccm Hefesaft bei Zusatz von Brenz- traubensäure g	Gärkraft des Hefesaftes nach Buchner		
			Sub- stanz	Toluol Kreide		A vor dem Versuch	B nach dem Versuch ohne Zusatz	T nach dem Versuch bei Zusatz von Trauben- zucker			Br Versuch von Brenz- trauben- säure	
12	1913 4./IV.	6 Stunden	1	1	—	0,1545	0,1710	0,1882	0,0990	0,0555	2,1674	
13	30./IV.	2 Tage	1	2	—	0,2685	0,3150	0,3645	0,2220	0,0465	2,4830	
13	15./V.	2 Tage	1	2	1	0,2052	0,2160	0,3906	0,1584	0,0468	2,4516	

Natriumsalzes nicht nur keine Milchsäure gebildet, sondern es konnte sogar bei allen drei Versuchen ein teilweises Verschwinden vorgebildeter Milchsäure festgestellt werden. Kontrollversuche zeigten, daß ein durch die Methode etwa bedingter Milchsäureverlust in dieser Höhe vollkommen ausgeschlossen war. Die Gesamtgärkraft der angewandten Hefesäfte war in allen drei Fällen eine gute, ebenso die Anfangsgärung.

Daß Brenztraubensäure bei der alkoholischen Gärung keine Milchsäure gebildet hat, ist im allgemeinen nichts Überraschendes. Man kann wohl annehmen, daß ihre auch bei Macerationssaft starke Gärfähigkeit, wie sie von Neuberg und Rosenthal¹⁾ festgestellt wurde, es nicht zu der Nebenreaktion der Milchsäurebildung kommen läßt, wenn überhaupt im Hefesaft eine solche aus Brenztraubensäure möglich ist. Schwieriger zu erklären ist das direkte Verschwinden von Milchsäure beim Zusatze von Brenztraubensäure. Vielleicht liegt hier die Stimulierung einer, wenn auch nicht auf dem Hauptwege liegenden, so doch vielleicht als Nebenreaktion möglichen Milchsäurevergärung durch Brenztraubensäure vor, bei welcher die gärträge Milchsäure in die Gärung hineingezogen wird.

Freilich ist dies einstweilen nur eine Hypothese, die auf ihre Richtigkeit noch näher zu prüfen ist. Die bereits in Angriff genommenen Versuche werden vielleicht zeigen, wie man sich den weiteren Abbau der Milchsäure vorzustellen hat. Hier sei nur auf die Möglichkeit hingewiesen, daß er denselben Weg nimmt, wie nach der Vorstellung Embdens im Tierkörper, daß also eine Oxydation zu Brenztraubensäure vielleicht parallel ginge mit einer gleichzeitigen reduktiven Umwandlung von aus Brenztraubensäure gebildetem Acetaldehyd zu Alkohol. Vielleicht ist es aber auch nur ein direkter Zerfall in Alkohol und Kohlensäure, also eine reine Carboxylasewirkung. Haben doch Neuberg und Tir²⁾ bei ihren Studien über zuckerfreie Gärung gefunden, daß auch Milchsäure in gewisser Beziehung «gärfähig» ist. Allerdings beobachteten sie im besten

¹⁾ C. Neuberg und P. Rosenthal, Biochem. Zeitschrift, Bd. 51, S. 128 (1913).

²⁾ C. Neuberg und L. Tir, Biochem. Zeitschr., Bd. 32, S. 324 (1911).

Falle nur eine Kohlensäureentwicklung von 3,5 ccm gegen 11 ccm unter denselben Versuchsbedingungen bei Brenztraubensäure.

Zusammenfassung.

Alles in allem zeigen die Versuche übereinstimmend, daß bei der zellfreien Gärung des Hefemacerationssaftes unter Ausschluß von Bakterien Milchsäure als Nebenprodukt der alkoholischen Gärung gebildet wird.

Die Steigerung der Milchsäurebildung bei Zuckerzusatz beweist ferner, daß die Annahme von Zucker als Milchsäurequelle bei der alkoholischen Gärung berechtigt ist.

Die weiterhin sehr erhebliche Steigerung der Milchsäurebildung bei Zusatz von Glycerinaldehyd und Dioxyaceton zu Hefesaft läßt die Anschauung als berechtigt erscheinen, daß diese beiden Substanzen als Vorstufen der Milchsäure bei der alkoholischen Gärung in Betracht kommen können. Die beobachtete weitaus raschere und stärkere Angreifbarkeit des Glycerinaldehyds gegenüber Dioxyaceton läßt vielleicht auch den Schluß zu, daß Glycerinaldehyd ebenso wie beim Zuckerabbau im tierischen Organismus auch bei der alkoholischen Gärung die direkte Vorstufe der Milchsäure ist.

Durch die Tatsache, daß Glycerinaldehyd im Hefemacerationssaft der weitaus stärkere Milchsäurebildner ist, dürfte auch die früher von Embden, Baldes und Schmitz, sowie von Embden und dem Verfasser ausgesprochene Vermutung, daß Dioxyaceton als Hauptquelle der Gärungsmilchsäure in Betracht komme, wesentlich an Wahrscheinlichkeit verlieren.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht weiterhin hervor, daß Brenztraubensäure im Gegensatz zu den Ergebnissen beim tierischen Organismus bei der alkoholischen Gärung unter den gewählten Versuchsbedingungen als Milchsäurequelle wohl nicht in Betracht kommen kann.

Wie erklärt sich nun der anscheinende Widerspruch, daß bei bakterienfreier Gärung mit lebender Hefe keine Milchsäure auftritt? Vielleicht finden wir einen Fingerzeig in einer bereits von Pasteur für andere Nebenprodukte der alkoholischen

Gärung entwickelte Ansicht. Obwohl Pasteur¹⁾ das gleichmäßige Auftreten der Nebenprodukte der Gärung innerhalb gewisser Grenzen im allgemeinen betont, findet sich doch auch der Hinweis, daß manchmal Ausnahmen auftreten: ein sehr langsamer Verlauf der Gärung soll Glycerin- und Bernsteinsäurebildung begünstigen, also verminderte Reaktionsgeschwindigkeit einer Anhäufung von Nebenprodukten möglich machen.

Auch von anderer Seite¹⁾ ist späterhin eine Abhängigkeit des Entstehens der Nebenprodukte von allen möglichen Faktoren festgestellt worden.

Betrachtet man nun die Gärung mit ihren Nebenreaktionen als Konkurrenz von Enzymen, so liegt die Frage nahe, welche Faktoren in diesen «Konkurrenzkampf» eingreifen können. Es besteht nun kein Zweifel, daß sowohl beim Hefepreßsaft wie beim Hefemacerationssaft die spezifischen Gärungsenzyme, welche unter dem Namen Zymase zusammengefaßt werden, geschädigt resp. geschwächt sind, so daß die Säfte schwächer und langsamer gären, während die lebende Hefe im Besitze ihrer ungeschwächten Gärkraft steht.

Andererseits scheinen die Fermente, welche bei der Milchsäurebildung beteiligt sind, viel widerstandsfähiger zu sein und weit weniger unter der Wirkung der Hefesaftbereitung zu leiden.

Unter Berücksichtigung der bekannten Tatsachen und der eigenen Beobachtungen kann man deshalb vielleicht den Satz aufstellen, daß die Milchsäurebildung abhängig ist von der Gärfähigkeit der Hefe resp. des Hefesaftes. Die vollständig intakten Enzyme bei der Gärung mit einer Reinkultur lebender Hefezellen lassen eine Milchsäurebildung nicht aufkommen. Je mehr dagegen die Gärkraft lebender Hefezellen oder eines Hefesaftes geschädigt oder auch nur vorübergehend gehemmt ist, desto stärker ist die Milchsäurebildung.

¹⁾ Vgl. Buchner-Hahn, Zymasegärung, S. 216 ff.