

# Über Brenztraubensäure als Aktivator der alkoholischen Gärung.

Von

**Max Oppenheimer.**

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut der Universität Frankfurt).

(Der Redaktion zugegangen am 30. Oktober 1914.)

Vor Kurzem<sup>1)</sup> konnte an dieser Stelle über Versuche berichtet werden, welche zeigten, daß aus zu Hefemazerations-saft in Form ihres Alkalisalzes zugesetzter Brenztraubensäure im Gegensatz zu Glycerinaldehyd und Dioxyaceton keine Milchsäure gebildet wurde; es wurde im Gegenteil die im Preßsaft vorgebildete Milchsäure teilweise zum Verschwinden gebracht.

Inzwischen wiederholt angestellte Versuche konnten diese Tatsache nur bestätigen.

Über den Mechanismus des Verschwindens von Milchsäure bei Zusatz von brenztraubensauren Salzen zu Hefesaft konnten damals nur Vermutungen ausgesprochen werden. Weitere Versuche sollten dazu beitragen nach Möglichkeit diese Erscheinung aufzuklären. Diese Versuche sind noch im Gange und über ihr etwaiges Ergebnis wird zu einem späteren Zeitpunkt Mitteilung gemacht werden.

Dagegen soll jetzt schon über einige neue Tatsachen berichtet werden, welche sich im Verlaufe dieser Untersuchungen ergeben haben.

## I.

Bei den oben erwähnten fortgesetzten Versuchen über Milchsäurebildung bei der alkoholischen Gärung wurde die bisher gewählte Versuchsanordnung in der Weise ergänzt, daß nicht nur Versuche mit Zusatz von brenztraubensaurem Salze allein und — zum Vergleiche — von Traubenzucker allein zum Hefesafte angestellt wurden, sondern es wurde auch noch ein weiterer Ansatz gemacht, zunächst mit gleichen Teilen Traubenzucker und brenztraubensaurem Natrium. Dies in der Absicht, um festzustellen, ob nicht vielleicht durch Zusatz von brenztraubensaurem Salze die bei Traubenzucker beobachtete

<sup>1)</sup> Max Oppenheimer, Diese Zeitschr., Bd. 89, S. 45, 1914.

Neubildung von Milchsäure gehemmt würde, oder ob sich lediglich Mittelwerte aus den Versuchen mit Zusatz jeder Substanz für sich ergäben.

Neben der Milchsäure wurde bei diesen Versuchen nun auch die gebildete Kohlensäuremenge bestimmt um eventuelle Beziehungen zwischen Milchsäurebildung resp. deren Verschwinden und Kohlensäurebildung feststellen zu können.

Die Bestimmung der Kohlensäure geschah nach Buchner, genau wie bei den früher beschriebenen Gärkraftbestimmungen. Eine kleine Abänderung der Apparatur erwies sich als sehr zweckmäßig: statt der üblichen Erlenmeyer-Kolben wurden für die Ansätze kleine Kultur-Kolben von ca. 125 ccm Inhalt mit sehr breitem Boden gewählt, wodurch die Oberfläche vergrößert und die Wägung wesentlich erleichtert wurde.

Die Ansätze verblieben, wenn nicht anders angegeben, bei Zimmertemperatur (20—22°).

Da im übrigen die Versuche in der aus den früheren Mitteilungen bekannten Anordnung angestellt wurden, ergibt sich alles weitere aus den folgenden Tabellen.

Das Ergebnis schon des ersten Versuches war überraschend.

Tabelle I.  
(Vers. vom 2./12. 13.)

Bezeichnung der Ansätze	Zusatz zu 35 ccm Hefesaft + 0,7 Tol.	mg CO <sub>2</sub> nach			
		1 Std.	6 Std.	24 Std.	30 Std.
T	3,5 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung 3,5 ccm Wasser	0,3	39,3	69,8	76,5
Br	3,5 ccm Lösung von brenztraubensaurem Na. (10% ig in Bezug auf Säure) 3,5 ccm Wasser	6,3	15,8	35,0	40,6
TBr	3,5 ccm Traubenzuckerlösung w. o. 3,5 ccm brenztraubensaures Na. w. o.	58,2	82,2	117,9	130,6
T + Br	[Berechnet als Summe der beiden ersten Horizontalreihen]	6,6	55,1	104,8	117,1

Während nach einer Stunde aus Traubenzucker kaum mehr als eine Spur  $\text{CO}_2$  gebildet worden war (Ansatz T), zeigte die Brenztraubensäure (Ansatz Br) eine deutliche  $\text{CO}_2$ -Bildung, die Bildung von  $\text{CO}_2$  aus dem Ansatz mit gleichen Teilen Traubenzucker und mit brenztraubensaurem Na (Ansatz TBr) betrug dagegen fast das neunfache der Summe der beiden Einzelversuche T und Br.

Nach 6 Stunden hatte bereits eine deutliche  $\text{CO}_2$ -Entwicklung aus Traubenzucker eingesetzt, welche die ebenfalls vermehrte  $\text{CO}_2$ -Entwicklung aus Brenztraubensäure um das doppelte übertraf, aber auch die  $\text{CO}_2$ -Bildung aus dem Versuche mit beiden Zusätzen war weiter gestiegen und die hierbei gebildete Menge  $\text{CO}_2$  betrug noch 50% mehr, als die Summe der  $\text{CO}_2$ -Menge der Einzelversuche ausmachte.

Nach 24 resp. 30 Stunden hatte die Vergärung der einzelnen Ansätze weitere Fortschritte gemacht, die Menge  $\text{CO}_2$  aus dem Ansätze mit beiden Zusätzen betrug immer noch 10% mehr als die  $\text{CO}_2$ -Menge der beiden Einzelansätze zusammen.

Nach 30 Stunden wurde der Versuch zum Zwecke der Milchsäurebestimmung abgebrochen.

Der Versuch zeigt also eine ganz ausgesprochene Vermehrung der  $\text{CO}_2$ -Bildung bei gleichzeitiger Vergärung von Traubenzucker und Brenztraubensäure als Alkalisalz gegenüber der Einzelvergärung dieser Substanzen mit gleichen Mengen Hefesaft.

Diese experimentelle Tatsache gestattet zunächst noch keine einheitliche Deutung. Die bei den einzelnen Versuchen gebildete Kohlensäure dürfte wohl derselben Quelle entstammen. Nach unseren heutigen Anschauungen über die Stellung der Brenztraubensäure beim Zuckerabbau ist ja die Zerlegung der Brenztraubensäure durch die Carboxylase nichts anderes als ein Teilvorgang der alkoholischen Gärung und die Carboxylase selbst ein Teilferment der unter dem Namen Zymase zusammengefaßten Gärungsfermente.

Handelt es sich nun bei der beobachteten Erscheinung der so stark vermehrten  $\text{CO}_2$ -Bildung um eine gegenseitige Beeinflussung der Traubenzucker- und Brenztraubensäuregärung oder liegt eine einseitige Stimulierung vor entweder der Carboxylasetätigkeit, sodaß die vermehrte  $\text{CO}_2$ -Bildung der

Brenztraubensäure entstammen würde, oder der Tätigkeit der Zymase, so daß das Mehr an  $\text{CO}_2$  auf Rechnung des Traubenzuckers zu setzen wäre? Weitere Versuche mußten in dem einen oder anderem Sinne entscheiden.

Es wurden zur Klärung der Frage zunächst bei der gemischten Vergärung, wie die gleichzeitige Vergärung von Traubenzucker und Brenztraubensäure genannt sein mag, die prozentualen Anteile der einzelnen Zusatzsubstanzen verändert, wie des näheren aus der Tabelle II ersichtlich ist.

Tabelle II.  
(Versuch vom 5./12. 13.)

Bezeichnung der Ansätze	Zusatz zu 35 ccm Hefesaft + 0,7 Tol.	Zugesetzte Substanz in Prozenten des unverdünnten Saftes	mg $\text{CO}_2$ nach		
			1 Std.	6 Std.	24 Std.
T	3,5 ccm 10%ige Traubenzuckerlösung 3,5 ccm Wasser	1% Traubenzucker	17,2	57,8	81,8
Br	3,5 ccm 10%ige Lösung von brenztraubens. Na 3,5 ccm Wasser	1% brenztraubensaures Na	19,6	37,8	53,2
TBr I	3,5 ccm Traubenzuckerlösung w. o. 1,75 ccm Lösung v. brenztraubens. Na w. o. 1,75 ccm Wasser	1% Traubenzucker 0,5% brenztraubensaures Na	48,9	77,3	98,9
TBr II	3,5 ccm Lösung v. brenztraubens. Na w. o. 1,75 ccm Traubenzuckerlösung w. o. 1,75 ccm Wasser	1% brenztraubensaures Na 0,5% Traubenzucker	43,2	65,0	81,4
TBr III	3,5 ccm Traubenzuckerlösung w. o. 0,35 ccm Lösung v. brenztraubens. Na w. o. 3,2 ccm Wasser	1% Traubenzucker 0,1% brenztraubensaures Na	97,3	158,9	208,7
TBr IV	3,5 ccm Lösung v. brenztraubens. Na 0,35 ccm Traubenzuckerlösung 3,2 ccm Wasser	1% brenztraubensaures Na 0,1% Traubenzucker	24,4	39,6	60,4

Das Ergebnis der  $\text{CO}_2$ -Bestimmungen dieses Versuches zeigt unzweifelhaft, daß es sich bei der beobachteten  $\text{CO}_2$ -Vermehrung um nichts anderes handelte, als um eine Beschleunigung der Traubenzuckervergärung.

Während die  $\text{CO}_2$ -Bildung aus brenztraubensaurem Na bei Zusatz von Traubenzucker in verschiedenen absteigenden Mengen nur unwesentlich erhöht wurde, kaum um mehr als die dem zugesetzten Traubenzucker entsprechende  $\text{CO}_2$ -Menge beträgt, stieg die  $\text{CO}_2$ -Bildung aus Traubenzucker bei Zusatz von 0,5% brenztraubensaurem Na, ganz besonders aber bei Zusatz von nur 0,1% schon nach 1 Stunde auf das beinahe sechsfache des Wertes der Einzelvergärung derselben Menge Traubenzucker.

Nach 6 Stunden war der  $\text{CO}_2$ -Wert bei der gemischten Vergärung des Ansatzes TBr III immer noch beinahe dreimal so groß und nach 24 Stunden war das Verhältnis der  $\text{CO}_2$ -Werte 81,8 zu 208,7, d. h. während nach dieser Zeit Traubenzucker allein etwa zur Hälfte vergoren war, hatte sich bei Zusatz von nur 0,1% Brenztraubensaurem Na bereits die theoretisch aus beiden Substanzen maximal mögliche  $\text{CO}_2$ -Menge ausgeschieden, ja sogar noch etwas mehr, jedenfalls zufolge einer nebenherlaufenden Selbstgärung des Saftes.

Nachdem im vorhergehenden Versuche die stimulierende Beeinflussung der Traubenzuckergärung durch Brenztraubensäure in Form ihres Alkalisalzes erwiesen war und sich dabei graduelle Unterschiede gezeigt hatten, sollte der nächste Versuch zeigen, wo die optimale Grenze dieser Einwirkung liegt. Je ein Versuch mit Brenztraubensäurevergärung und Selbstgärung wurde angeschlossen (siehe umstehende Tabelle).

Der Versuch bestätigt in einwandfreier Weise das Resultat des vorhergehenden Versuches und zeigt noch deutlicher als dieser, daß die nach 1 Stunde um beinahe 600% vermehrte  $\text{CO}_2$ -Bildung bei Zusatz von brenztraubensaurem Alkali zu gärender Zuckerlösung wohl ausschließlich eine Aktivierung der alkoholischen Gärung darstellt.

Die Beschleunigung trat noch bei einem Zusatz brenztraubensauren Salzes von 1 : 10000 des Hefesaftes ein, resp.

Tabelle III.

(Vers. vom 7. 1. 14.)

Bezeichnung der Ansätze	Zusatz zu 40 ccm Hefesaft + 0,8 Tol.	Zugesetzte Subst. in Prozenten des unverdünnten Saftes	mg CO <sub>2</sub> nach		
			1 Std.	5 Std.	24 Std.
B	4 ccm Wasser	— (Selbstgärung)	2,8	5,6	9,6
T	4 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung	1% Traubenzucker	12,6	63,6	108,6
Br	4 ccm 10% ige Lösung v. brenztraubens. Na.	1% brenztraubensaur. Na.	13,6	34,0	46,4
Br <sub>1</sub>	4 ccm 1% ige Lösung v. brenztraubens. Na.	1‰ brenztraubensaur. Na.	5,6	10,6	16,0
TBr <sub>1</sub>	4 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung 0,4 ccm 10% ige Lösung v. brenztraubens. Na.	1% Traubenzucker 1‰ brenztraubensaur. Na.	85,8	203,8	316,8
TBr <sub>2</sub>	4 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung 0,4 ccm 1% ige Lösung v. brenztraubens. Na.	1% Traubenzucker 0,1‰ brenztraubensaur. Na.	82,0	191,4	295,0

1 : 100 des Zuckers, wobei noch die 20% ige Verdünnung durch die Lösungsmittel zu berücksichtigen ist. Bei diesem Zusatz beträgt die aus Brenztraubensäure theoretisch mögliche Menge CO<sub>2</sub> nur 2 mg, ist also unbedenklich zu vernachlässigen.

Nach 24 Stunden betrug die Beschleunigung noch immer fast 200%. Die Werte waren bei 1‰ und 0,1‰ Zusatz fast identisch. Auch bei diesem Versuche wurde das theoretische CO<sub>2</sub>-Bildungs-Maximum überschritten, ohne daß eine andere Erklärung als eine Stimulierung der Selbstgärung möglich wäre, ähnlich wie sie neuerdings auch von Lvoff<sup>1)</sup> beobachtet wurde. Die Gärkraft des Saftes war bei diesem Versuche eine gute, die Selbstgärung unbedeutend und kann unberücksichtigt bleiben. Die Einzelgärung des Traubenzuckers

<sup>1)</sup> Lvoff, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 3, S. 289, 1913.

und des brenztraubensauren Salzes zeigte das charakteristische Bild: zu Anfang stärkere  $\text{CO}_2$ -Bildung aus Brenztraubensäure, dann allmähliches Nachlassen und Überholtwerden durch den stärker gärenden Traubenzucker.

Nach dem Ergebnis der bisher geschilderten Versuche muß man also die brenztraubensauren Salze den stärksten der bisher bekannten Katalysatoren der alkoholischen Gärung zählen. Ob die beschleunigende Wirkung jedoch eine spezifische ist, muß noch dahingestellt bleiben, vielleicht ist sie eine Gruppenreaktion organischer Salze. Konnten doch vor etwa Jahresfrist Euler und Cassel<sup>1)</sup> in einer vorläufigen Mitteilung berichten, daß eine Reihe von Salzen organischer Säuren, besonders solchen der Ameisensäure-Reihe und von Oxysäuren eine katalytische Wirkung auf die alkoholische Gärung ausüben. Allerdings hatten die Autoren nur bei Versuchen mit lebender Hefe Erfolg und betonen ausdrücklich, daß Trockenhefe und Preßsaft durch die Salzzusätze nicht oder nur unwesentlich in der Gärwirkung gefördert wurden.

Im Gegensatz hierzu beweisen die vorliegenden Versuche für die Salze der Brenztraubensäure eine überaus starke Beeinflussung der Gärwirkung des Hefesaftes. Die an und für sich wünschenswerten vergleichenden Versuche mit lebender Hefe unterblieben mit Rücksicht auf den Vorbehalt, welchen sich Euler und Cassel gemacht haben. Die Schlußfolgerung von Euler und Cassel, daß die aktivierenden Salze ihre beschleunigende Wirkung entweder überhaupt nicht auf die Gärungsenzyme ausüben oder daß das von diesen Salzen beeinflusste Enzym nur in der frischen Hefe zur Geltung kommt, dürfte jedenfalls bei den brenztraubensauren Salzen nicht zutreffen.

In einer vor kurzem erschienenen Mitteilung von Palladin, Gromoff und Monteverde<sup>2)</sup> berichten diese Autoren u. a. über Versuche der gemeinsamen Vergärung von Saccharose und brenztraubensaurem Kali. Der eine dieser Versuche (8), welcher mit Hefanol angesetzt wurde, ergab zwar in den ersten

<sup>1)</sup> Euler und Cassel, Diese Zeitschr. Bd. 86, S. 122, 1913.

<sup>2)</sup> Palladin, Gromoff u. Monteverde, Biochem. Zeitschr. Bd. 62, S. 138, 1914.

2 Stunden ähnlich wie bei meinen Versuchen mit Traubenzucker eine Vermehrung der  $\text{CO}_2$ -Ausscheidung, die um 42% größer war als die Summe der  $\text{CO}_2$ -Bildung der Einzelversuche. Aber bereits nach 4 Stunden war diese  $\text{CO}_2$ -Ausscheidung derart herabgesunken, daß sie schon unter der Summe der Einzelausscheidungen blieb, so daß man also im Gegenteil von einer Gärungshemmung sprechen kann.

Bei einem weiteren Versuche (9) mit Hefesaft blieb sogar die  $\text{CO}_2$ -Ausscheidung bei gemeinschaftlicher Vergärung von Saccharose und Brenztraubensäure von allem Anfang an ungefähr 30% hinter der Summe der Einzelgärungen zurück.

Die Deutung, welche Palladin den Resultaten des einen positiven Versuches gibt, scheint mir insbesondere nach dem Ergebnis der eigenen Versuche recht zweifelhaft zu sein. Nicht eine Beeinflussung der Carboxylasewirkung durch Saccharose dürfte vorgelegen haben, sondern umgekehrt eine beschleunigte Angärung der Saccharose unter dem Einfluß des brenztraubensauren Salzes. Auch scheint es mir zweifelhaft, ob die Verhältnisse so liegen, daß bei einer Mitwirkung der Carboxylase bei der alkoholischen Gärung ein Teil derselben für diesen Prozeß verausgabt wird und «nur der Rest» bei der Zerlegung der Brenztraubensäure Verwendung findet. So scharf dürften wohl diese Vorgänge nicht zu trennen sein.

Außerdem sind die Verhältnisse bei der Saccharosevergärung sicherlich komplizierter als bei der von mir gewählten Traubenzuckervergärung. Es ist nicht ausgeschlossen, daß das von Palladin beobachtete Sinken der  $\text{CO}_2$ -Ausscheidung bei der gemeinsamen Vergärung auf eine Invertase-Hemmung durch brenztraubensaures Salz resp. den bei der Brenztraubensäurevergärung entstehenden Acetaldehyd zurückzuführen ist.

## II.

Während die Vergärung der brenztraubensauren Salze relativ glatt von statten ging, bereitete die Vergärung der freien Brenztraubensäure den bisherigen Untersuchern zunächst Schwierigkeiten.

Die ersten Beobachter,<sup>1)</sup> Neuberg und Hildesheimer,<sup>2)</sup> folgerten sogar aus ihren Versuchen, daß die freie Brenztraubensäure nicht gäre. In einer späteren Abhandlung konnten dann Neuberg und Karczag<sup>3)</sup> berichten, daß mit gärkräftigen Reinzuchthefen, sowie mit etwas größeren Mengen gewöhnlicher Preßhefe die Vergärung der freien Brenztraubensäure ohne Schwierigkeiten gelinge. Doch erklärten die Autoren es für unmöglich, sämtliche Brenztraubensäure zum Verschwinden zu bringen wegen der hemmenden Wirkung des entstehenden Acetaldehyds.

In einer weiteren Mitteilung berichten Neuberg und Karczag,<sup>4)</sup> daß bei Zusatz von Antisepticiis es ihnen nur mit Hefanol in Gegenwart von Toluol gelungen sei, freie Brenztraubensäure zu vergären.

Daß die Carboxylase in der durch Chloroform und Toluol abgetöteten Hefe freie Brenztraubensäure nicht, wohl aber deren Salz vergärt, kann nach Neuberg und Karczag verschiedene Gründe haben: «Einmal erfahren viele Enzyme durch Antiseptika Schädigungen, und man könnte sich vorstellen, daß eine weitere Beeinträchtigung durch die für die Carboxylase nicht ganz gleichgültige freie Brenztraubensäure ausreicht, um die Gärung dann völlig zu unterdrücken. Ferner aber können durch die Behandlung mit Chloroform, Toluol usw. die physikalisch-chemischen Zustände der Hefezelle derart geändert worden sein, daß das Enzym nur noch mit den Salzen, nicht aber mit der freien Brenztraubensäure in mechanische Berührung zu treten vermag» (l. c. S. 81).

Später konnten dann Neuberg und Kerb<sup>5)</sup> die Ver-

<sup>1)</sup> Aus einer kurz vor der Mitteilung von Neuberg und Hildesheimer veröffentlichten Notiz von O. Neubauer (Diese Zeitschr., Bd. 70, S. 350, 1911) geht leider nicht mit Sicherheit hervor ob die von ihm angedeuteten Versuche mit freier Brenztraubensäure oder, wie bei den anderen Säuren mit dem Salze angestellt wurden, ferner auch nicht ob wie bei den anderen Versuchen die Versuche in Gegenwart von Rohrzucker angestellt wurden, was natürlich für die vorliegende Frage von Wichtigkeit wäre.

<sup>2)</sup> Neuberg u. Hildesheimer, Bioch. Zeitschr., Bd. 31, S. 172 (1911).

<sup>3)</sup> Neuberg u. Karczag, Biochem. Zeitschr., Bd. 36, S. 69, 1911.

<sup>4)</sup> Neuberg u. Karczag, Biochem. Zeitschr., Bd. 36, S. 80, 1911.

<sup>5)</sup> Neuberg u. Kerb, Biochem. Zeitschr., Bd. 53, S. 406, 1913.

gärung der freien Brenztraubensäure mit lebender Hefe ohne Toluolzusatz in großem Maßstabe durchführen.

Harden,<sup>1)</sup> welcher mit Zymin und Lebedewscher Trockenhefe, nachdem er sie durch Waschen und Acetonbehandlung von Koenzym befreit hatte, leichterdings gepufferte Brenztraubensäure in  $\text{CO}_2$  und Acetaldehyd zerlegen konnte, während ihm dies mit freier Brenztraubensäure kaum gelang, meint, daß dies schlechte Ergebnis mit freier Brenztraubensäure auf die Wirkung der Acidität der Lösung auf das Enzym zurückzuführen sei.

Palladin, Gromoff und Monteverde schließen aus ihren Versuchen in der bereits erwähnten Arbeit, daß die Fähigkeit, freie Brenztraubensäure mit verschiedenen Trockenpräparaten der Hefe zu vergären sehr gering sei und daß freie Brenztraubensäure auf das Zymin als ein die Selbstgärung aufhaltendes Gift einwirke.

Über die Einwirkung von Hefemacerationssaft auf freie Brenztraubensäure liegen von Neuberg und Rosenthal<sup>2)</sup> einige, allerdings sehr knappe, Angaben vor. Die Autoren beobachteten, daß bei der von ihnen gewählten Versuchsanordnung (Hefesaft + gleiche Teile 1%iger wässriger Brenztraubensäurelösung) und bei einer Versuchstemperatur von  $37^\circ$  schon nach 2—8 Sekunden eine Gasentwicklung ( $\text{CO}_2$ ) einsetzte, welche gewöhnlich innerhalb 2 Stunden aufhörte. Dieses frühzeitige Aufhören der Gärung scheint den Autoren ebenfalls darauf zu beruhen, daß die freie Brenztraubensäure in dem Hefesaft Schädigungen der Enzyme verursache.

Obwohl diese früheren Beobachtungen mit freier Brenztraubensäure in keiner Weise dazu ermutigten, schien es mir trotzdem nach den Ergebnissen der voranstehend mitgeteilten Versuche wünschenswert zu prüfen, ob die Eigenschaft der Gärungsbeschleunigung nur den Salzen der Brenztraubensäure zukommt, oder ob nicht vielmehr die freie Brenztraubensäure auch dieselbe Wirkung hat.

<sup>1)</sup> Harden, Biochemical Journ. Bd. 7, S. 214, 1913.

<sup>2)</sup> Neuberg u. Rosenthal, Biochem. Bd. 51. S. 128, 1913.

Auch diese Versuche wurden mit Hefemacerationsaft angestellt und das Ergebnis von zwei Versuchen sei tabellarisch mitgeteilt (Tabelle IV u. V).

Tabelle IV.  
(Versuch vom 23./1. 14.)

Bezeichnung der Ansätze	Zusatz zu 40 ccm Hefesaft + 0,4 Tol.	Zugesetzte Substanz in Prozenten des unverdünnten Saftes	mg CO <sub>2</sub> nach			
			1 Std.	4 Std.	6 Std.	24 Std.
T	4 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung 4 ccm Wasser	1% Traubenzucker	34,8	71,0	80,8	116,0
Br	4 ccm 10% ige Brenztraubensäurelösung 4 ccm Wasser	1% Brenztraubensäure	63,4	106,2	118,0	147,6
TBr	4 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung 4 ccm 10% ige Brenztraubensäurelösung	1% Traubenzucker 1% Brenztraubensäure	81,0	195,6	238,8	262,6
TBr <sub>1</sub>	4 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung 4 ccm 1% ige Brenztraubensäurelösung	1% Traubenzucker 0,1% Brenztraubensäure	43,4	80,2	91,8	125,4
TBr <sub>2</sub>	4 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung 0,4 ccm 1% ige Brenztraubensäurelösung 3,6 ccm Wasser	1% Traubenzucker 0,01% Brenztraubensäure	36,8	67,6	77,0	111,0
TBr-Br			17,6	89,4	119,2	115,0

Aus diesen Versuchen geht nun zunächst hervor, daß freie Brenztraubensäure unter den gewählten Versuchsbedingungen mit Hefemacerationsaft nicht nur überhaupt gärt, sondern daß diese Gärung eine sehr starke und langanhaltende sein kann. Nach 24 Stunden war bei Zimmertemperatur die Gärung noch in starkem Gange, und es war bei dem einen Versuche nach dieser Zeit 75% der theoretisch möglichen Menge vergoren, die entwickelte Menge CO<sub>2</sub> betrug fast 40% mehr als die aus der gleichen Menge Traubenzucker.

Tabelle V.

(Versuch vom 10./2. 14.)

Bezeichnung der Ansätze	Zusatz zu 40 ccm Hefesaft + 0,4 Tol.	Zugesetzte Substanz in Prozenten des unverdünnten Saftes	mg CO <sub>2</sub> nach			
			1 Std.	4 Std.	6 Std.	24 1/2 Std.
T	4 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung 4 ccm Wasser	1% Traubenzucker	15,0	44,8	65,4	109,2
Br	4 ccm 10% ige Brenztraubensäurelösung 4 ccm Wasser	1% Brenztraubensäure	76,4	116,4	133,2	149,0
Br <sub>1</sub>	4 ccm 1% ige Brenztraubensäurelösung 4 ccm Wasser	0,1% Brenztraubensäure	6,0	9,0	11,6	17,8
TBr	4 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung 4 ccm 10% ige Brenztraubensäurelösung	1% Traubenzucker 1% Brenztraubensäure	91,0	197,6	238,6	308,6
TBr <sub>1</sub>	4 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung 4 ccm 1% ige Brenztraubensäurelösung	1% Traubenzucker 0,1% Brenztraubensäure	21,8	62,8	89,4	135,8
TBr <sub>2</sub>	4 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung 0,4 ccm 1% ige Brenztraubensäurelösung 3,6 ccm Wasser	1% Traubenzucker 0,01% Brenztraubensäure	17,0	50,6	70,8	116,0
TBr—Br	Absolute CO <sub>2</sub> -Werte für Traubenzucker bei gemeinsamer Vergärung mit Brenztraubensäure. Die in Klammer befindlichen Zahlen zeigen das Mehr an CO <sub>2</sub> -Bildung gegenüber der Einzelvergärung von Traubenzucker.		14,6	81,2 (+36,4)	105,4 (+40,0)	159,6 (+50,4)
TBr <sub>1</sub> —Br <sub>1</sub>			15,8 (+0,8)	53,8 (+9,0)	77,8 (+12,4)	118,0 (+8,8)

Dieses Ergebnis steht im gewissen Widerspruch zu den Beobachtungen von Neuberg und Rosenthal. Allerdings handelt es sich mehr um quantitative als um qualitative Unterschiede. Immerhin sind weitere genauere Versuche bei verschiedenen Temperaturen und Konzentrationen wünschenswert,

um Fragen, wie die Gärungsgeschwindigkeit der Brenztraubensäure zu entscheiden.

Es sei im Zusammenhang damit auch gleich die aus den weiter unten beschriebenen Versuchen (Tabelle XI u. XII) entnommenen auf Brenztraubensäuregärung bezüglichen Zahlen tabellarisch zusammengestellt und besprochen.

Tabelle VI.

Zusatz zu 40 ccm Hefesaft 4 » Wasser 0,4 » Toluol	Versuch vom 24./2. 14 mg CO <sub>2</sub> nach		Versuch vom 27./2.14 mg CO <sub>2</sub> nach	
	1 Stunde	4 Stunden	1 Stunde	4 Stunden
4 ccm 10%ige Lösung von brenztraubensaur. Na	24,4	39,6	23,0	40,6
4 ccm 10%ige Lösung von Traubenzucker	42,2	84,8	36,8	88,0
4 ccm 10%ige Lösung von Brenztraubensäure	101,0	145,4	88,6	120,0

Diese Versuche welche zu verschiedenen Zeiten und mit Saft aus Trockenhefen verschiedener Sendungen bei 28° angestellt wurden, zeigen übereinstimmend bereits nach 4 Stunden bei freier Brenztraubensäure fast dieselbe hohe CO<sub>2</sub>-Entwicklung (120 resp. 145 mg) wie sie bei Zimmertemperatur nach 24 Stunden erreicht wurde.

Für die Beurteilung der Gärfähigkeit der freien Brenztraubensäure aber besonders wichtig und lehrreich ist der Vergleich mit den CO<sub>2</sub>-Werten derselben Versuche, welche sich aus der Vergärung der gleichen Mengen brenztraubensauren Natriums und Traubenzuckers ergeben haben. Diese vergleichenden Zahlen zeigen, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen Brenztraubensäure mit Macerationsaft nicht nur stärker vergärt wie Traubenzucker, was oben schon gezeigt wurde, sondern entgegen früheren Erfahrungen anderer Autoren mit lebender Hefe auch um ein mehrfaches stärker als brenztraubensaures Na.

Aus den mitgeteilten Beobachtungen dürfte einwandfrei hervorgehen, daß die von Neuberg, Harden, sowie Palladin angenommene Enzymschädigung durch freie Brenztraubensäure nicht wohl möglich ist.

Für die Versuche mit lebender Hefe wird wohl der zweite der von Neuberg und Karczag für die Gärungsstörung durch Antiseptika gegebenen Erklärungsversuche zutreffen und an eine physikalisch-chemische Zustandsänderung der Hefezelle zu denken sein, bei welcher es sich wohl um eine Permeabilitätsstörung handeln dürfte.

Für das rasche Ablauen der Reaktion bei den Versuchen von Neuberg und Rosenthal mit Macerationssaft muß dagegen nach einer anderen Erklärung gesucht werden. Vielleicht war die relativ hohe Versuchstemperatur ( $37^{\circ}$ ) nicht ganz ohne Einfluß auf den Ablauf der Reaktion, obwohl gerade Neuberg und Rosenthal auf die hohe Hitzebeständigkeit der Carboxylase hingewiesen haben.

Von besonderem Interesse dürfte das Ergebnis der Versuche der Tabelle IV und V auch in Bezug auf die Frage der Gärungsbeschleunigung durch freie Brenztraubensäure sein.

Nachdem es sich gezeigt hatte, daß im Macerationssaft freie Brenztraubensäure kein Fermentgift ist, war die Frage noch offen, ob die freie Säure auch ebenso stimulierend auf die Traubenzuckergärung wirken würde wie ihre Salze. Dies umsomehr, als bisherige Beobachtungen<sup>1)</sup> bei anorganischen wie organischen Säuren in den entsprechenden Konzentrationen eher eine Gärungshemmung erwarten ließen.

Aber es zeigte sich schon beim ersten Versuche, daß Brenztraubensäure nach anfänglicher Hemmung, wenn man das Zurückbleiben der gemeinsamen Vergärung gegen die Summe der Einzelgärungen als solche bezeichnen will, eine Stimulierung der Traubenzuckervergärung herbeiführte, welche zwar nicht so beträchtlich war wie bei den Versuchen mit brenztraubensauren Salzen, aber immerhin nach 6 Stunden

<sup>1)</sup> F. Johannessohn, Biochem. Zeitschr. Bd. 47, S. 97 (1912). M. Rosenblatt und Frau, Bull. Soc. Chim. d. France [4] Bd. 13, S. 924 (1913), Chem. Zentralbl. 1913 Bd. II, S. 1765.

etwa 50% betrug, wie aus dem Vergleich der Werte T und der Differenzwerte TBr—Br hervorgeht.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit brenztraubensaurem Na scheint hier das Aktivierungsoptimum bei Zusatz von 1% Säure zu liegen, da ein Zusatz von 1‰ Säure nur unbedeutende, von 0,1‰ überhaupt keine Beschleunigung zeigte.

Noch deutlicher ist das Ergebnis des zweiten Versuches:

Bei Zusatz von 1% Säure nach 4 Stunden eine Beschleunigung von ca. 80%, nach 6 Stunden eine solche von ca. 60% und nach 24½ Stunden immer noch eine Beschleunigung von beinahe 50%! Die in den ersten Stunden überaus stürmische CO<sub>2</sub>-Entwicklung war nach dieser Zeit immer noch nicht beendet.

Auch der Zusatz von nur 1‰ Brenztraubensäure ergab bei diesem Versuche eine, wenn auch kleinere, so doch immerhin deutliche Gärungsbeschleunigung.

Übereinstimmend zeigen also die Versuche, daß freie Brenztraubensäure, ebenso wie ihre Salze die Traubenzuckergärung mit Hefemacerationssaft beschleunigt. Diese Beschleunigung ist bei der Säure offenbar von einer anderen Größenordnung als bei ihren Salzen, auch scheint für eine optimale Wirkung der freien Säure eine höhere H-Ionenkonzentration notwendig, wodurch gerade die beschleunigende Wirkung umso überraschender erscheinen dürfte.

Die Versuchsergebnisse mit Brenztraubensäure und ihren Salzen mahnen auch dazu, alle bisherigen Angaben über Kohlensäurebildung aus Brenztraubensäure in Gegenwart von Kohlenhydraten mit Vorsicht aufzunehmen. Was als reine Carboxylasewirkung betrachtet wurde, kann, zum mindesten teilweise, vielleicht auch auf Stimulierung einer Kohlenhydratvergärung zurückgeführt werden.

### III.

Das Ergebnis der Versuche mit Brenztraubensäure und ihren Salzen legte die Frage nahe, ob die beobachtete beschleunigende Wirkung ausschließlich der Brenztraubensäure

zuzuschreiben sei, oder nicht vielmehr dem durch Carboxylase-wirkung aus Brenztraubensäure sich bildenden Acetaldehyd.

Acetaldehyd entsteht wohl ohnedies bei jeder Gärung und ist auch tatsächlich, wenn auch nur in relativ kleinen Mengen, in jedem Gärgute vorhanden.

Nun hat bereits v. Lebedew<sup>1)</sup> Versuche ausgeführt, um zu sehen wie sich Acetaldehyd verhält, wenn er sich im gärwirksamen Saft mit Zucker befindet. Aus dem Ergebnis der vorliegenden zwei Versuche, welche mit Saccharose angestellt wurden, schloß der Verfasser, daß im Gegensatz zu lebender Hefe, für die Acetaldehyd bekanntlich ein Gift ist, Hefemacerationssaft den Aldehyd gut verträgt. Die Gesamtmenge der aus Zucker gebildeten Kohlensäure war am Ende des Versuchs mit und ohne Zusatz von Aldehyd dieselbe; in den ersten Stunden war eine deutliche Hemmung der CO<sub>2</sub>-Entwicklung bei Aldehydzusatz zu beobachten.

Bei ähnlichen Versuchen konnten Kostytschew und Hübbenet<sup>2)</sup> feststellen, daß die Zunahme der Alkoholproduktion von einer Steigerung der CO<sub>2</sub>-Abscheidung nicht begleitet war, mit anderen Worten, daß die von ihnen gefundene Mehrproduktion von Alkohol aus dem Acetaldehyd stammte und nicht aus einer durch diesen erhöhten Vergärung des angewandten Traubenzuckers.

Ferner liegen über die Einwirkung des Acetaldehyds auf die Gärung einige Beobachtungen von Euler und Sahlén<sup>3)</sup> vor. Diese Autoren fanden, daß Acetaldehyd zu einer mit lebender Hefe gärenden Rohrzuckerlösung zugesetzt auf die Gärung hemmend einwirke, bei einer optimalen Konzentration von etwa 0,05% aber vorübergehend reize und dann in eine Hemmung übergehe.

Aber wir haben oben bei der Besprechung der Versuche von Palladin, Gromoff und Monteverde bereits gesehen, daß Rohrzucker- und Traubenzuckervergärung verschieden ver-

<sup>1)</sup> v. Lebedew, Berichte Bd. 45, S. 3263, 1912.

<sup>2)</sup> Kostytschew und Hübbenet, Diese Zeitschr. Bd. 79, S. 372, 1912.

<sup>3)</sup> Euler, Hans und Sahlén, Jacob, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie Bd. III, S. 225, 1913.

laufen können, ebenso haben die bisherigen Versuche erst recht deutlich gezeigt, daß der Zusatz von Substanzen bei Gärung mit lebender Hefe und bei zellfreier Gärung ganz wesentlich verschiedene Ergebnisse zeigen kann.

Hier sei auch daran erinnert, daß Hexosephosphat, welches so leicht von Hefesaft und Trockenhefe angegriffen wird, von lebender Hefe nicht vergoren wird.

Es schien deshalb sehr wohl angebracht, die Acetaldehyd-Zusatz-Versuche mit Traubenzucker und Hefemacerationsaft zu wiederholen.

Die Versuche wurden mit sehr kleinen Zusätzen angesetzt, um nach Möglichkeit eine Fermentschädigung auszuschließen. Überdies war ja auch bei den Versuchen mit Brenztraubensäure anzunehmen, daß der hierbei jeweils entstehende Aldehyd zu seinem größten Teile weiter zu Alkohol reduziert wird, wie dies ja auch die Versuche von Neuberg und Kerb gezeigt haben, so daß es niemals zu einer Anreicherung größerer Aldehydmengen kommen dürfte.

Das Ergebnis von zwei Versuchen sei tabellarisch wiedergegeben (siehe umstehende Tabellen).

Der erste Versuch (VII) zeigt nun tatsächlich eine deutliche Stimulierung der Angärung durch Acetaldehyd, die am größten ist bei einem Zusatz von 1:200 000, bei welchem sie nach 1 Stunde rund 250% beträgt. Nicht viel kleiner ist diese Beschleunigung bei einem Zusatz von 1:400 000. Nach 6 Stunden beträgt die Beschleunigung immer noch über 20%, nach 24 Stunden etwa 10%.

Bemerkenswert bei diesem Versuch ist die schlechte Gärkraft des verwandten Hefesaftes (0,0426 nach 24 St.).

Nicht so deutlich ist das Ergebnis bei dem zweiten Versuche (Tabelle VIII). Die geringere Beschleunigung ist vielleicht auf den höheren Gehalt der gärenden Flüssigkeit an zugesetztem Aldehyd zurückzuführen, welcher bei diesem Versuch 1:10 000 resp. 1:100 000 betrug. Auffallend ist gegenüber dem vorhergehenden Versuche, daß der Zusatz 1:10 000 besser wirkte wie derjenige von 1:100 000, was sich besonders deutlich bei der Selbstgärung zeigte, welche durch den kleineren Zusatz

Tabelle VII.

(Versuch vom 29./1. 14.)

Bezeichnung der Ansätze	Zusatz zu 40 ccm Hefesaft + 0,4 Tol.	Zugesetzter Aldehyd in Prozenten des unverdünnten Saftes	mg CO <sub>2</sub> nach			
			1 Std.	4 Std.	6 Std.	24 Std.
B	8 ccm Wasser	— (Selbstgärung)	0	0	0	2,4
T	4 ccm 10%ige Traubenzuckerlösung 4 ccm Wasser	—	4,8	47,6	58,8	103,2
TA	4 ccm 10%ige Traubenzuckerlösung 4 ccm 0,5%igen Aldehydlösung	0,05% (1 : 2000)	12,2	57,2	70,6	113,8
TA <sub>1</sub>	4 ccm 10%ige Traubenzuckerlösung 0,4 ccm 0,5%ige Aldehydlösung 3,6 ccm Wasser	0,005% (1 : 20000)	8,6	48,6	60,0	97,8
TA <sub>2</sub>	4 ccm 10%ige Traubenzuckerlösung 0,4 ccm 0,05%ige Aldehydlösung 3,6 ccm Wasser	0,0005% (1 : 200000)	17,2	56,6	71,0	112,8
TA <sub>3</sub>	4 ccm 10%ige Traubenzuckerlösung 0,2 ccm 0,05%ige Aldehydlösung 3,8 ccm Wasser	0,00025% (1 : 400000)	16,2	51,9	66,6	106,2

nicht beeinflusst wurde, während der größere eine Vermehrung der ausgeschiedenen CO<sub>2</sub> um über 100% ergab.

Auch bei diesem Versuche zeigte der angewandte Hefesaft eine sehr mäßige Angärung (0,0914 nach 24 St.).

Als unzweifelhaftes Ergebnis der beiden mitgeteilten Versuche kann man feststellen, daß auch dem Acetaldehyd in entsprechender Verdünnung eine beschleunigende Wirkung bei der alkoholischen Gärung des Traubenzuckers mit Macerations-

Tabelle VIII.  
(Versuch vom 6./2. 14.)

Bezeichnung der Ansätze	Zusatz zu 40 ccm Hefesaft + 0,4 Tol.	Zugesetzter Aldehyd in Prozenten des unverdünnten Saftes	mg CO <sub>2</sub> nach			
			1 Std.	4 Std.	6 Std.	24 Std.
B	8 ccm Wasser	—	2,4	3,0	3,6	5,2
BA	7,6 ccm Wasser 0,4 ccm 0,1 %ige Aldehydlösung	0,001 % (1 : 100000)	2,0	2,4	3,0	5,0
BA <sub>1</sub>	4 ccm Wasser 4 ccm 0,1 %ige Aldehydlösung	0,01 % (1 : 10000)	5,8	6,4	7,4	10,0
T	4 ccm Wasser 4 ccm 10 %ige Trauben- zuckerlösung	—	21,2	55,0	70,0	107,2
TA	3,6 ccm Wasser 4 ccm 10 %ige Trauben- zuckerlösung 0,4 ccm 0,1 %ige Aldehyd- lösung	0,001 % (1 : 100000)	23,0	57,4	72,8	111,4
TA <sub>1</sub>	4 ccm 10 %ige Trauben- zuckerlösung 4 ccm 0,1 %ige Aldehyd- lösung	0,01 % (1 : 10000)	26,6	60,6	76,8	108,0

saft zukommt. Bei der gegenüber der Brenztraubensäure und ihren Salzen schwächeren Wirkung des Acetaldehyds jedoch kann ein Zusammenhang mit der Beschleunigung durch Brenztraubensäure nicht sicher behauptet werden, wenn auch ein solcher nicht ausgeschlossen ist, da ja die Einwirkung in statu nascendi eine andere sein kann, als bei Zusatz fertiger Substanz.

#### IV.

Die auffallend große Gärungsbeschleunigung, welche mit Brenztraubensäure resp. ihrem Na-Salze bei Traubenzucker-gärung erzielt werden konnte, ließ es auch wünschenswert erscheinen, zu untersuchen, ob durch Brenztraubensäure auch

die Gärung anderer Substanzen aktiviert werden kann, namentlich solcher Substanzen, welche bisher als schlecht oder als gänzlich vergärbar galten.

Ich habe nun zunächst drei Substanzen herausgegriffen, deren Vergärbarkeit wegen ihrer Rolle beim Zuckerabbau im Mittelpunkt des Interesses steht, das Dioxyaceton und den Glycerinaldehyd, außerdem diejenige Substanz, welche den Ausgangspunkt der ganzen vorliegenden Untersuchungen bildet, die Milchsäure.

Vom Dioxyaceton wissen wir durch die Arbeiten von Buchner und Meisenheimer,<sup>1)</sup> daß es relativ leicht vergärbar ist. Durch einen Zusatz von Kochsaft zum Preßsaft wird die Gärung ganz wesentlich begünstigt.

Nun ist aber die Angärung des Dioxyacetons eine recht langsame. Es interessierte deshalb besonders, ob nicht vielleicht neben der Begünstigung der Gärung überhaupt vor allem die Angärung des Dioxyacetons durch Brenztraubensäure beschleunigt würde.

Dasselbe gilt ganz besonders auch für Glycerinaldehyd, welchen Buchner und Meisenheimer auch bei Kochsaft-Zusatz nur in beschränktem Maße vergären konnten. Ebenso mußten Lebedew und Griatznoff<sup>2)</sup> aus ihren Versuchen den Schluß ziehen, daß Glycerinaldehyd bedeutend schwächer, zum mindesten langsamer vergoren wird als Saccharose.

Die Ergebnisse von zwei Versuchen sind in den Tabellen IX und X zusammengestellt (siehe umstehende Tabellen).

Beide Versuche zeigen nun tatsächlich bei Dioxyaceton eine Beschleunigung der Angärung, wenn dieselbe auch nicht von dem erwarteten Umfange war. Bemerkenswert ist, daß die  $\text{CO}_2$ -Werte für Dioxyaceton nach 24 Stunden fast dieselben waren wie für Traubenzucker. Es ist dies eine Bestätigung der Angaben von Buchner und Meisenheimer, wonach Dioxyaceton ebenso gut, wenn auch langsamer vergärbar ist wie Traubenzucker. Gleichzeitig ist es eine wiederholte Wider-

<sup>1)</sup> Buchner u. Meisenheimer, Berichte Bd. 43, S. 1778, 1910.  
Buchner u. Meisenheimer, Berichte Bd. 45, S. 1633, 1912.

<sup>2)</sup> v. Lebedew u. Griatznoff, Bericht Bd. 45, S. 3256, 1912.

Tabelle IX.  
(Versuch vom 9./1. 14.)

Bezeichnung der Ansätze	Zusatz zu 40 ccm Hefesaft + 0,4 Tol.	Zugesetzte Substanz in Prozenten des unverdünnten Saftes	mg CO <sub>2</sub> nach			
			1 Std.	5 Std.	7 Std.	24 Std.
B	4 ccm Wasser	—	0	1,0	1,4	3,2
Br	3,6 ccm Wasser 0,4 ccm 10%ige Lösung v. Brenztraubens. Na.	0,1% Brenztraubensäures Na.	1,8	4,0	4,0	8,2
G	3,6 ccm Wasser 0,4 g Glycerinaldehyd	1% Glycerinaldehyd	2,0	5,2	6,4	19,2
GBr	3,2 ccm Wasser 0,4 g Glycerinaldehyd 0,4 ccm 10%ige Lösung v. Brenztraubensäur. Na.	1% Glycerinaldehyd 0,1% Brenztraubensäures Na.	4,6	9,8	10,2	19,8
D	3,6 ccm Wasser 0,4 g Dioxyaceton	1% Dioxyaceton	3,4	38,0	61,8	105,4
DBr	3,2 ccm Wasser 0,4 g Dioxyaceton 0,4 ccm 10%ige Lösung v. Brenztraubensäur. Na.	1% Dioxyaceton 0,1% Brenztraubensäures Na.	6,4	46,6	83,0	135,8

legung von Sator, welcher Dioxyaceton für nicht vergärbare erklärte.

Weniger günstig war das Ergebnis bei Glycerinaldehyd. Zwar kann namentlich bei den Versuchen der Tabelle X die CO<sub>2</sub> aus der zugesetzten Brenztraubensäure vernachlässigt werden, die theoretisch maximal nur 2 mg beträgt, in Wirklichkeit natürlich noch unter diesem Werte liegt. Aber trotzdem ist die Beschleunigung der Glycerinaldehydvergärung bei den vorliegenden Versuchen eine derart geringe, daß dieselbe für das Problem der Vergärbbarkeit des Glycerinaldehyds nicht viel besagt.

Auch Versuche mit Zusatz freier Brenztraubensäure hatten kein anderes Ergebnis, wohl aus dem Grunde, weil an und

Tabelle X.  
(Versuch vom 20./1. 14.)

Bezeichnung der Ansätze	Zusatz zu 40 ccm Hefesaft + 0,4 Tol.	Zugesetzte Substanz in Prozenten des unverdünnten Saftes	mg CO <sub>2</sub> nach		
			1 Std.	6 Std.	24 Std.
B	4 ccm Wasser	—	0	6,6	15,6
Br	3,6 ccm Wasser 0,4 ccm 1%ige Lösung von brenztraubens. Na	0,01% brenz- traubens. Na	0	8,2	16,4
T	4 ccm 10%ige Trauben- zuckerlösung	1% Traubenzucker	22,4	77,4	128,4
TBr	4 ccm 10%ige Trauben- zuckerlösung 0,4 ccm 1%ige Lösung von brenztraubens. Na	1% Traubenzucker 0,01% brenz- traubensaur. Na	48,8	95,6	143,8
G	3,6 ccm Wasser 0,4 g Glycerinaldehyd	1% Glycerinaldehyd	0	8,6	18,0
GBr	3,2 ccm Wasser 0,4 g Glycerinaldehyd 0,4 ccm 1%ige Lösung von brenztraubens. Na	1% Glycerinaldehyd 0,01% brenz- traubensaur. Na	0,8	10,4	19,2
D	3,6 ccm Wasser 0,4 g Dioxyaceton	1% Dioxyaceton	0,4	54,2	122,2
DBr	3,2 ccm Wasser 0,4 g Dioxyaceton 0,4 ccm 1%ige Lösung von brenztraubens. Na	1% Dioxyaceton 0,01% brenz- traubensaur. Na	1,4	69,4	138,2

für sich schon Glycerinaldehyd ein Plasmagift ist, wie auch Lebedew und Griatznoff festgestellt haben, und durch Zusatz der freien Säure die ausflockende Wirkung des Glycerinaldehyds sicher noch verstärkt wird. Allerdings beobachtete ich mit Brenztraubensäure allein nie eine Ausflockung in dem Maße wie sie Neuberg und Rosenthal (l. c. S. 136) erzielt zu haben scheinen, sondern lediglich eine mehr oder weniger starke milchige Trübung des Ansatzes.

Weitere Versuche mit veränderter Versuchsanordnung werden vielleicht zu einem günstigeren Resultat führen.

### V.

Die oben erwähnten früheren Versuche hatten gezeigt, daß bei Vergärung von brenztraubensaurem Natrium vorgebildete Milchsäure teilweise verschwindet. Hierbei war eine Vergärung von Milchsäure wahrscheinlich gemacht, jedoch nicht einwandfrei erwiesen. Dieser Beweis dürfte jedoch ziemlich sicher erbracht sein, wenn es gelang, bei gemeinsamer Vergärung von zugesetzter Milchsäure mit Brenztraubensäure resp. ihrem Na-Salze eine  $\text{CO}_2$ -Bildung zu erzielen, die eine Stimulierung der vorher wegen ihrer Kleinheit nicht, oder kaum merkbaren Milchsäurevergärung ergab.

Die Versuche, welche in den beiden Tabellen XI und XII zusammengestellt sind, zeigen nun unzweideutig, daß in der Tat bei Zusatz von 1% Brenztraubensäure zu Hefesaft mit zugesetztem 1% Milchsäure in Form des Na-Salzes eine deutliche  $\text{CO}_2$ -Mehrbildung vorhanden ist, welche wohl nur auf die Vergärung der Milchsäure zurückgeführt werden kann.

Bei dem einen Versuche (Tabelle XI) ergab sich bei Zusatz von Brenztraubensäure bereits nach 1 Stunde ein absoluter  $\text{CO}_2$ -Wert (erhalten durch die Differenz der gemeinsamen Vergärung und der Einzelvergärung von Brenztraubensäure) von 26,8 mg. Bei 5 mg für Milchsäure allein wäre dies eine Beschleunigung von über 400%. Da der durchaus zulässige Vergleich mit dem Parallelversuche (Tabelle XII) zeigt, daß auch diese 5 mg mit höchster Wahrscheinlichkeit nur von Selbstgärung herrühren, so ergibt sich aus dem Versuche eine erhebliche Stimulierung einer vorher überhaupt nicht erkennbaren Milchsäurevergärung durch freie Brenztraubensäure.

Einen etwas kleineren, aber durch den Vergleich mit der Selbstgärung besonders deutlichen Wert für die Milchsäurevergärung gibt der bereits erwähnte zweite Versuch (Tabelle XII): auch nach 4 Stunden noch keine  $\text{CO}_2$ -Bildung aus Milchsäure allein. Bei Zusatz freier Brenztraubensäure-Werte, die nach 1 Stunde 15,6 mg, nach 4 Stunden noch 11,8 mg höher sind, als die leeren Brenztraubensäure-Werte.

Tabelle XI.

(Versuch vom 23./2. 14.)

Temp. 28°.

Bezeichnung der Ansätze	Zusatz zu 40 ccm Hefesaft + 0,4 Tol.	Zugesetzte Substanz in Prozenten des unverdünnten Saftes	mg CO <sub>2</sub> nach	
			1 Std.	4 Std.
Br	4 ccm Wasser 4 ccm brenztraubensaur. Na. 10% ig	1% brenztraubens. Na	24,4	39,6
Br <sub>1</sub>	4 ccm Wasser 4 ccm Brenztraubensäure 10% ig	1% Brenztrauben- säure	101,0	145,4
M	4 ccm Wasser 4 ccm milchsaures Na 10% ig	1% milchsaures Na	5,0	9,0
T	4 ccm Wasser 4 ccm Traubenzucker 10% ig	1% Traubenzucker	42,2	84,8
MBr	4 ccm milchsaure. Na 10% ig 4 ccm brenztraubens. Na 10% ig	1% milchsaures Na 1% brenztraubens. Na	24,2	43,6
MBr <sub>1</sub>	4 ccm milchsaure. Na 10% ig 4 ccm Brenztraubensäure 10% ig	1% milchsaures Na 1% Brenztrauben- säure	127,8	152,6
TBr	4 ccm Traubenzucker 10% ig 4 ccm brenztraubens. Na 10% ig	1% Traubenzucker 1% brenztrauben- saur. Na	35,2	144,2
TBr <sub>1</sub>	4 ccm Traubenzucker 10% ig 4 ccm Brenztraubensäure 10% ig	1% Traubenzucker 1% Brenztrauben- säure	131,4	278,8
MBr-Br	Absolute CO <sub>2</sub> -Werte für Milchsäure resp. Traubenzucker bei gemeinsamer Vergärung mit Brenztraubensäure resp. dessen Na-salz. Die in Klammer befindlichen Zahlen zeigen das Mehr (resp. Weniger) an CO <sub>2</sub> -Bildung gegenüber der Einzelvergärung von Milch- säure resp. Traubenzucker.		-0,2	4,0
MBr <sub>1</sub> -Br <sub>1</sub>			26,8 (+21,8 resp. 26,8)	7,2 (-1,8 resp. +7,2)
TBr-Br			60,8 (+18,6)	104,6 (+19,8)
TBr <sub>1</sub> -Br <sub>1</sub>			30,4 (-11,8)	133,4 (+48,6)

**Tabelle XII.**  
 (Versuch vom 26./2. 14.)  
 Temp. 28°.

Bezeichnung der Ansätze	Zusatz zu 40 ccm Hefesaft + 0,4 Tol.	Zugesetzte Substanz in Prozenten des unverdünnten Saftes	mg CO <sub>2</sub> nach	
			1 Std.	4 Std.
B	8 ccm Wasser	— (Selbstgärung)	5,8	9,8
Br	4 ccm Wasser 4 ccm brenztraubens. Na 10 ‰ ig	1 ‰ brenztrauben- saurer Na	23,0	40,6
Br <sub>1</sub>	4 ccm Wasser 4 ccm Brenztraubensäure 10 ‰ ig	1 ‰ Brenztrauben- säure	88,6	120,0
M	4 ccm Wasser 4 ccm milchsaures Na 10 ‰ ig	1 ‰ milchsaures Na	5,8	8,0
T	4 ccm Wasser 4 ccm Traubenzucker 10 ‰ ig	1 ‰ Traubenzucker	36,8	88,0
MBr	4 ccm milchsaures Na 10 ‰ ig 4 ccm brenztraubens. Na 10 ‰ ig	1 ‰ milchsaures Na 1 ‰ brenztrauben- saurer Na	25,0	42,4
MBr <sub>1</sub>	4 ccm milchsaures Na 4 ccm Brenztraubensäure 10 ‰ ig	1 ‰ milchsaures Na 1 ‰ Brenztrauben- säure	104,2	131,8
TBr	4 ccm Traubenzucker 10 ‰ ig 4 ccm brenztraubens. Na 10 ‰ ig	1 ‰ Traubenzucker 1 ‰ brenztrauben- saurer Na	80,2	144,6
TBr <sub>1</sub>	4 ccm Traubenzucker 10 ‰ ig 4 ccm Brenztraubensäure 10 ‰ ig	1 ‰ Traubenzucker 1 ‰ Brenztrauben- säure	117,4	257,6
M-B	Absoluter CO <sub>2</sub> -Wert für Milchsäure nach Abzug der Selbstgärung		0	0
MBr-Br	} Vgl. Tabelle XI.		2,0	1,8
MBr <sub>1</sub> -Br <sub>1</sub>			(+ 2,0)	(+ 1,8)
TBr-Br			15,6	11,8
TBr <sub>1</sub> -Br <sub>1</sub>			(+ 15,6)	(+ 11,8)
			57,2	104,0
			(+ 20,4)	(+ 16,0)
			28,8	137,6
			(- 8,0)	(+ 49,6)

Eine Aktivierung durch brenztraubensaures Natron war demgegenüber nur andeutungsweise festzustellen.

Auch die zum Vergleiche gleichzeitig mit dem Milchsäureversuche angesetzten Versuche mit Traubenzucker unter absolut denselben Bedingungen hatten ein ähnliches Ergebnis. Nach 4 Stunden bei freier Säure eine Beschleunigung von jeweils 50%, bei dem Parallelversuche mit dem Na-Salze nur eine solche von etwa 20%.

Die auf den beiden Tabellen vergleichsweise nochmals aufgeführten  $\text{CO}_2$ -Werte der Einzelvergärung sind schon früher besprochen worden (vgl. Tabelle VI).

Wenn auch über den Weg des Abbaus der Milchsäure auf diese Weise noch nichts gesagt werden kann, so scheint doch eines gesichert: Milchsäure ist entgegen der bisherigen Annahme, besonders von Buchner und Meisenheimer, vergärbar, und diese Gärung wird ganz im Sinne der früher<sup>1)</sup> ausgesprochenen Vorstellung durch Brenztraubensäure stimuliert.

### Zusammenfassung.

I. Die Traubenzuckervergärung durch Hefemacerations-saft wird sowohl bei Zimmertemperatur wie bei 28° durch Zusatz von Brenztraubensäure in Form ihres Alkalisalzes im hohen Maße beschleunigt. Die Beschleunigung der Angärung beträgt je nach der Gärkraft des angewandten Saftes bis zu mehreren hundert Prozent, der optimale Zusatz ist etwa 1‰ der Substanz, berechnet auf unverdünnten Hefesaft, welcher durch die Lösungsmittel noch um 10—20% verdünnt wird.

II. Freie Brenztraubensäure zeigt nach anfänglicher Hemmung unter denselben Versuchsbedingungen ebenfalls eine Beschleunigung der Traubenzuckervergärung bis zu etwa 50%. Das Optimum des Zusatzes liegt bei etwa 1‰ der Substanz im obigen Sinne.

Im Gegensatz zu früheren Beobachtungen anderer Autoren vor allem bei lebender Hefe ist die freie Brenztraubensäure mit Hefemacerationssaft nicht nur leicht vergärbar, sondern

<sup>1)</sup> Max Oppenheimer, Diese Zeitschr., Bd. 89, S. 60 (1914).

die CO<sub>2</sub>-Entwicklung ist auch lange anhaltend und übertrifft diejenige aus gleichen Mengen brenztraubensaurem Salz und Traubenzucker.

Die festgestellten Tatsachen lassen auch eine Enzym-schädigung durch freie Brenztraubensäure unwahrscheinlich erscheinen.

III. Die Stimulierung der Traubenzuckervergärung wird, wenn auch im wesentlich geringerem Maße, ebenfalls erzielt durch dem Hefesaft zugesetzten Acetaldehyd, optimal bei einem Zusatze von etwa 1 : 200 000. Da sich bei der Brenztraubensäurevergärung durch Carboxylase Acetaldehyd bildet, ist es nicht ausgeschlossen, daß dieser in statu nascendi katalytisch auf die Gärung wirkt, durch die bisherigen Versuche ist dieser Zusammenhang jedoch nicht absolut sicher gestellt.

IV. Ebenso wie die Traubenzuckervergärung wird auch die Dioxyacetonvergärung durch brenztraubensaures Alkali beschleunigt, allerdings in geringerem Umfange.

Eine mehr als angedeutete Beschleunigung der Glycerinaldehydvergärung konnte bei den vorliegenden Versuchen nicht beobachtet werden.

V. Ganz im Sinne früher entwickelter Anschauungen konnte festgestellt werden, daß Brenztraubensäure und ihre Salze eine Stimulierung der Vergärung von Milchsäure durch Hefemacerationssaft herbeiführen, welche ohne diesen Zusatz nicht nachweisbar ist.

---