

Über den abweichenden Verlauf der Alkoholgärung in alkalischen Medien.

Von

Alice Oelsner und Alfred Koch.

(Aus dem landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut der Universität Göttingen.)
(Der Redaktion zugegangen am 28. August 1918.)

Normalerweise verläuft die alkoholische Gärung der Hefe immer in sauren Medien, weil Pflanzensäfte meist sauer sind und die Hefe außerdem durch Bildung von Bernsteinsäure und Kohlensäure während der Gärung selbst für saure Reaktion des Nährmediums sorgt. Dieser Umstand ist für die Hefe schon deshalb von Vorteil, weil er ihr die Konkurrenz mit den meist gegen Säure empfindlichen Bakterien erleichtert, die ihr sonst die Nährstoffe der Gärflüssigkeiten streitig machen würden.

Deshalb ist früher nur selten das Verhalten der Hefe in alkalischen Medien untersucht worden. Die bezügliche Literatur hat Hägglund¹⁾ zusammengestellt. Neuerdings haben dann Euler und Tholin²⁾ gefunden, daß bei der Alkalinität, welche durch den Farbenumschlag des Phenolphthaleins angegeben wird, Phosphate die alkoholische Gärung sowohl durch frische Hefe als durch Dauerhefe verzögern. Die Verzögerung wächst mit der Phosphatmenge. In saurer Lösung beschleunigt dagegen Phosphatzusatz die Alkoholgärung. Weiter haben dann Neuberg und Färber³⁾ gefunden, daß Zusatz von Alkalisatoren den Verlauf der Alkoholgärung nicht nur verzögert, sondern ganz umstimmt: Hefe bildet in alkalischen Medien weniger Alkohol und es wird weniger CO₂ frei. Doch läßt

¹⁾ Ahrens' Sammlung chemischer und chemisch-technischer Vorträge Bd. 21 (1915).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 97, S. 269 (1916).

³⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. 78 (1917).

sich schwer sagen, wieviel CO_2 durch den vorhandenen Alkalisator gebunden wird. Außerdem entsteht in alkalischen Medien mehr Aldehyd, sehr erheblich mehr Glycerin und ein neues alkoholisches Gärprodukt aus der Drei-Kohlenstoffreihe, das Trimethylenglykol.

Neuerdings veröffentlicht nun Wilenko¹⁾ einen „Beitrag zur Kenntnis der glykolytischen Prozesse“, in welchem er behauptet, daß „die Zuckergärung durch Hefe bei einem bestimmten Alkalitätsgrad und Regulatorengehalt der Gärungsflüssigkeit qualitativ verändert wird; es entsteht keine Kohlensäure“. Verf. stellt diese Beobachtung in Analogie zu der Glykolyse im Blute des Menschen, die mit minimaler, zu dem verschwundenen Zucker in gar keinem Verhältnis stehender CO_2 -Produktion verläuft. Da die Wilenkosche Beobachtung von großer Bedeutung für die Gärungschemie wäre, so versuchten wir sie durch Nachprüfung zu bestätigen, um so mehr als Wilenko angibt, daß er seine Untersuchungen nur unter bescheidenen Bedingungen im Laboratorium eines Festungsspitals ausführen konnte und daher seine Methodik keinen Anspruch auf quantitative Genauigkeit erheben könne. Er verfuhr in folgender Weise: 20 ccm 1%ige Glukoselösung wurde mit viel Preßhefe oder Trockenhefe versetzt und durch Zusatz von sekundärem Natriumphosphat bzw. eines Gemisches von sekundärem und primärem Natriumphosphat auf einen bestimmten Alkalitätsgrad gebracht. Nach 20–24stündigem Stehen im Einhornschen Gärungsröhrchen bei Zimmertemperatur wurde die entwickelte Gasmenge abgelesen, die Reaktion auf Lackmuspapier festgestellt und eine Probe der Flüssigkeit auf Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung untersucht. Die Röhrchen, die keine Gasentwicklung zeigten, wurden oft auf Körper, die Jodoformreaktion geben, mittels Alkali und Jodjodkali untersucht. Um etwaiges, in der alkalischen Gärungsflüssigkeit gebundenes CO_2 -Gas in Freiheit zu setzen, wurde mit Phosphorsäure angesäuert und die dabei frei gewordene Gasmenge abgelesen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 98, S. 255 (1917).

Wenn man mit diesen Angaben die Notiz von Buchner¹⁾ zusammenhält, daß die Zymasegärung durch Zusatz von schwachem Alkali (Kaliumkarbonat und sek. Natriumphosphat) beschleunigt wird, so kann man nicht gerade behaupten, daß diese Fragen mit übereinstimmendem Resultat untersucht seien. Wir haben daher die Wilenkosche Angabe nachuntersucht und wendeten zur Nachprüfung die in unserem Institut zur Untersuchung der alkoholischen Gärung übliche Methode an, indem 100 ccm Zuckerlösung mit Hefe und Phosphat versetzt in eine Flasche mit Gärverschluß gebracht und der Verlauf der Kohlensäureproduktion durch die Gewichtsabnahme verfolgt wurde. Nach beendeter Gärung wurde der gebildete Alkohol syknometrisch und der Zuckergehalt durch Titration mit Fehlingscher Lösung bestimmt. Wenn die Wilenkosche Beobachtung sich bestätigte und keine CO_2 gebildet wurde, so dürfte keine Gewichtsabnahme dieser Versuche stattfinden.

Die von Wilenko angewendete Zuckerkonzentration von 1% war für unsere Untersuchungsart etwas niedrig, um große Unterschiede der alkalischen gegen die normale saure Gärung zu zeigen, denn in letzterem Falle würde sich nur 0,46 g CO_2 aus 1 g Zucker bilden. Auch für die Untersuchung auf Alkohol und Restzucker war eine höhere Zuckerkonzentration von Vorteil. Wir setzten unsere Versuche daher zunächst mit 100 ccm 5%iger Glukoselösung an. Der Alkalitätsgrad wurde nach einem Versuch der Wilenkoschen Arbeit (S. 260) eingestellt, wo 4 ccm eines Gemisches von $n/3$ primärem und sekundärem Natriumphosphat im Verhältnis 1:16 in 20 ccm 1%iger Zuckerlösung, die 0,75 g Hefe enthält, völlig die CO_2 -Produktion unterdrücken sollen.

Für 100 ccm Zuckerlösung waren demnach 0,889 g Na_2HPO_4 und 0,05 g NaH_2PO_4 nötig, welchem Gemisch wir 20 g Preßhefe zusetzten. Diese Lösung färbt rotes Lackmuspapier gerade blau, ist also nur schwach alkalisch. Wir wendeten hier 5% Glukose an, ohne den Phosphatzusatz entsprechend zu erhöhen, trotzdem Wilenko angibt, daß mit

¹⁾ Zymasegärung S. 140.

steigender Zuckergabe mehr Phosphat notwendig sei, um die Glykolyse ohne Kohlensäurebildung zu ermöglichen. In der folgenden Versuchsreihe III nahmen wir dagegen auf diesen Umstand Rücksicht und wendeten bei 5% Zucker auch die fünffache Phosphatmenge an, also 100 ccm 5%ige Zuckerlösung mit 4,461 g Na_2HPO_4 , 0,235 g NaH_2PO_4 und 20 g Hefe. Als normale saure Gärung wurden schließlich zum Vergleich 100 ccm 5%ige Glukoselösung mit 4,541 g KH_2PO_4 und 20 g Hefe versetzt, so daß die Phosphormenge derjenigen des vorhergehenden stark alkalischen Versuches entsprach.

Um den Einwand zu entkräften, daß unsere 5%igen Zuckerlösungen vielleicht nicht direkt mit den 1%igen von Wilenko verglichen werden könnten, stellten wir auch einen alkalischen und einen sauren Versuch mit 150 ccm 1%iger Glukoselösung, dem nötigen Phosphatzusatz und 4 g Hefe an.

Tabelle I: Normale saure Gärung.

Zusammensetzung der Gärflüssigkeit in 100 ccm g	Nach Stunden	$\text{CO}_2 =$ Gewichts- abnahme g	CO_2 in Baryt auf- gefangen g	Alkohol in 100 ccm g	Zucker in 100 ccm g	Aldehyd- reaktion
5 Glukose 4,541 KH_2PO_4 20 Preßhefe	1½	1,0	0,006	2,36	unter 0,1%	gering
	15½	2,05				
	23	2,05				
	47	2,1				

Tabelle II: Schwach alkalische Gärung.
Phosphatmenge wie bei Wilenko.

In 100 ccm Lösung g	Nach Stunden	$\text{CO}_2 =$ Gewichts- abnahme g	CO_2 in Baryt auf- gefangen g	Alkohol in 100 ccm g	Zucker in 100 ccm g	Aldehyd- reaktion
5 Glukose 0,889 Na_2HPO_4 0,05 NaH_2PO_4 20 Preßhefe	1½	0,7		2,0	0	schwach, stärker als in I
	15½	1,85				
	39½	1,95				
	64	2,05				
	112	2,3				
	136	2,3				

Tabelle III: Stark alkalische Gärung.
 Phosphatmenge fünfmal so stark wie bei Wilenko,
 entsprechend fünffacher Zuckermenge.

In 100 cem g	Nach Stunden	CO ₂ = Gewichts- abnahme g	CO ₂ in Baryt auf- gefangen g	Alkohol in 100 cem g	Zucker in 100 cem g	Aldehyd- reaktion
5 Glukose 4,461 Na ₂ H PO ₄ 0,235 Na H ₂ PO ₄ 20 Preßhefe	1½	0,75				positiv stärker als in I
	15½	1,75				
	23	1,75	0,011	1,77	0	

Tabelle IV: 1% Glukose.

In 150 cem-Lösung g		Zucker- rest	CO ₂ g	Alkohol in 100 cem g	Beob- achtungs- zeit in Stunden
4 Preßhefe	Ohne Phosphat- zusatz Reaktion sauer	Spur	0,45	0,64	24
1% Glukose		{ 1,42 g Na ₂ H PO ₄ alkalisch }	unter 0,1%	{ 0,4	

Zu diesen Tabellen ist zu bemerken, daß die in der Gärflüssigkeit am Schlusse des Versuches absorbierte Menge CO₂ durch Ansäuern mit Schwefelsäure ausgetrieben und in titriertem Barytwasser aufgefangen wurde. In Versuch I und III ist diese beobachtete CO₂-Menge besonders angegeben.

Auf Aldehyd wurde qualitativ mit dem Tollensschen Reagens-ammoniakalischer Silbernitratlösung geprüft. Die Tabellen zeigen, daß die Gärung in den 5%igen Glukoselösungen sowohl bei der von Wilenko angewandten Alkalinität wie bei der fünffach stärkeren unter kräftig sichtbarer CO₂-Entwicklung verlief, welche schon 20 Minuten nach Eintragen der Hefe einsetzte und nach 1½ Stunden im

- sauren Versuch 1 g CO₂
- schwach alkalischen Versuch 0,70 „ „
- stark „ „ 0,75 „ „

lieferte. Die Gärung zeigt sich hiernach durch alkalische Reaktion allerdings verzögert, führt aber bei schwacher Alkalisierung zu annähernd normaler Durchgärung des Zuckers am sechsten Tage, wogegen in der stark alkalischen Gärung (III) die produzierten Mengen von CO_2 und Alkohol trotz vollständiger Umsetzung des Zuckers hinter den normalen zurückbleiben. Nach 24 Stunden bleibt hier die CO_2 -Entwicklung stehen. Der gebildete Alkohol entspricht der entstandenen CO_2 -Menge. Diese Beobachtungen stimmen ebenso wie diejenigen über das stärkere Auftreten von Aldehyd in den alkalischen Gärungen ganz mit den zitierten Angaben von Neuberg und Färber überein.

Auch in dem Versuch IV mit 1%iger Glukoselösung, der angestellt wurde, um dem Einwand zu begegnen, daß wir andere Resultate wie Wilenko und deutlich sichtbare Gärung auch in alkalischen Lösungen erhielten, weil wir fünffach stärkere Zuckerkonzentration anwendeten, trat sofort am ersten Tage Gasblasenentwicklung und Gewichtsabnahme auf. Eine kleine Schwächung der Gärung durch alkalische Reaktion tritt auch hier in der Alkoholproduktion hervor.

Natürlich ändert sich, wie auch Wilenko angibt, mit fortschreitender Gärung die Reaktion der Gärflüssigkeit, weil die Hefe ihr Bernsteinsäure und Kohlensäure zuführt. In unserem schwach alkalischen Versuch II wurde die Reaktion infolgedessen ungefähr gleichzeitig mit dem Eintritt sichtbarer Gärung sauer und färbte etwa 3 Stunden nach Zugabe der Hefe die Gärflüssigkeit blaues Lackmuspapier rot. Zu dieser Zeit zeigte der stark alkalisch angesetzte Versuch III erst neutrale Reaktion und wurde erst 5 Stunden nach Zugabe der Hefe sauer.

Die durch die alkalische Reaktion hervorgerufene Verzögerung und Umstimmung des normalen Gärprozesses wirkte daher in Versuch II nur kurze Zeit, in dem stärker alkalisch angesetzten Versuch III dagegen länger und trat daher in ihrer Wirkung hier stärker hervor.

Wir haben also die Wilenkosche Beobachtung, daß in durch Phosphat alkalischen Gärflüssigkeiten sichtbare Gärung

ausbleibe und trotzdem der Zucker verschwinde, nicht bestätigen können, sondern immer Produktion an Alkohol und CO_2 in solchen Lösungen gefunden. Es fragt sich nun, wie sich die abweichende Beobachtung von Wilenko erklärt. Zunächst ist zu bemerken, daß ein Teil des Zuckers verschwinden kann, ohne daß sichtbare Kohlensäurebildung auftritt, weil sich die gebildete Kohlensäure in der Gärflüssigkeit löst. Bei 20°C . löst ein Volum Wasser 0,9014 Volumen CO_2 und 1 ccm CO_2 wiegt 0,001965 g, also absorbieren 100 ccm Wasser 0,18 g CO_2 , welche aus 0,4 g Zucker bei der Gärung entstehen. 0,4% Zucker können also durch Gärung verschwinden, ohne daß sichtbare CO_2 -Entwicklung bemerkt wird. Aus 100 ccm vergorener 1% iger Glukoselösung erhielten wir durch Auskochen und Auffangen der ausgetriebenen Kohlensäure in Barytwasser im Pettenkofferrohr zweimal je 0,13 und einmal 0,20 g CO_2 . Aber Wilenko sah angeblich 1% Zucker ohne sichtbare Gärung verschwinden. Zunächst waren seine Hefen vielleicht alkaliempfindlicher wie die unsrigen. Daß die Hefen in dieser Richtung große Unterschiede zeigen, betonen sowohl Neuberger und Färber (l. c.) wie auch Euler¹⁾.

Wir haben deshalb zum Vergleich auch noch einen Versuch mit einer von Schroder in München bezogenen Trockenhefe nach Lebedeff im Einhornschen Gärröhrchen, also dem von Wilenko benutzten Apparat angestellt, aber auch hier beträchtliche Mengen CO_2 aus 0,2 g Glukose, 0,177 g $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ + 0,01 g $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ + 10 ccm Wasser und 6 ccm Wasser mit 0,3 g Trockenhefe erhalten.

Also auch mit dieser Hefe erhielten wir Kohlensäure bei Vergärung von Zucker in alkalischer Lösung und müssen daher darauf verzichten, aufzuklären, wie Wilenko zu seinem Resultat gekommen ist, dessen Richtigkeit wir nicht bestätigen konnten.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 100, Heft 2 (1917).