

Über das Wesen der Alkoholgärung.

Von

F. G. Kohl, Leipzig.

Die enzymatische Tätigkeit gärender Hefe wird bekanntlich durch die in der Gärflüssigkeit enthaltenen Substanzen in verschiedenster Weise beeinflusst. Aus später ersichtlichen Gründen interessierte mich besonders der Einfluß freier Säuren auf die Gärung, und zwar organischer Säuren. Man hat von jeher dieser Frage eingehendste Beachtung geschenkt, nicht allein, um den Einfluß der verschiedensten Stoffe auf die Gärtätigkeit der Hefe kennen zu lernen, sondern mehr noch, um zu erfahren, welche Stoffe besonders geeignet sind, die Entwicklung von Spaltpilzen der verschiedensten Art in gärenden Flüssigkeiten zu unterdrücken, ohne die Lebenstätigkeit resp. Gärtätigkeit der Hefe in merklicher Weise zu beeinträchtigen. Wenn man nun auch auf diesem Wege nicht dazu gelangte, eine völlige Unterdrückung aller fremden Mikroorganismen in der Gärflüssigkeit, oder gar eine solche der schädlichen Hefenarten zu erreichen, so zeitigten doch die diesbezüglichen Untersuchungen nach allen Richtungen wertvolle Resultate; es genügt, auf die glänzenden Erfolge Effronts mit Fluorammonium hinzuweisen, mit Hilfe dessen man in den Stand gesetzt wurde, das ursprüngliche Vergärungsvermögen zu verzehnfachen und außerdem gewisse Nebenprodukte zu eliminieren.

Die als Antiseptika den Bakterien gegenüber angewandten Stoffe legten nun nach den grundlegenden Untersuchungen von Schulz (Pflügers Arch. f. Phys. 42. 517) und den späteren von Biernacki (ebenda, 49. 112), wie zu erwarten war, eine die Lebensfähigkeit der Hefe für einige Zeit erhöhende und die Gärung beschleunigende und verstärkende Wirkung an den Tag, wenn sie unter gewissen Bedingungen in sehr geringen Mengen zur Anwendung kommen, wogegen sie nach den zahlreichen Beobachtungen anderer Forscher in größeren Mengen angewandt die Gärung ohne Zweifel hemmen oder gänzlich verhindern. So lag zum Beispiel das Optimum der Beschleunigung für Ameisensäure bei 0,01 ‰, für Salicylsäure bei 0,025 ‰ etc., während bei der Ameisensäure die hemmende Wirkung bei 0,1—0,2 ‰, bei der Salicylsäure sogar noch niedriger liegt. Es wurden in Bezug auf freie organische Säuren folgende Beziehungen gefunden:

Konzentrationen, welche wirken auf die Gärung		
	hemmend	hindernd
	%	%
Milchsäure ¹⁾	1,5	2,5
Ameisensäure	0,1—0,2	0,3
Essigsäure	0,5	1,0
Propionsäure	0,152	0,3
Buttersäure	0,05	0,1
Valeriansäure	0,1	0,15
Kaprionsäure ²⁾	—	0,06
	etc.	

Ähnlich ist die retardierende resp. prohibitive Wirkung der freien Weinsäure und Oxalsäure und deren Alkalisalze.³⁾ Hervorragend gärungshemmend erwiesen sich: Salicylsäure⁴⁾, Kresotinsäure⁴⁾, Pyrogallussäure, Gerbsäure, Oxyphenolsulfonsäure⁵⁾, die Oxynaphtoësäuren⁶⁾ und die Pyridinkarbonsäuren⁷⁾.

Diese gärungshemmende Wirkung der freien Säuren beruht jedenfalls zum Teil auf vorläufig noch nicht zu übersehenden Einflüssen auf das lebende Plasma der Zelle, zum Teil aber auch auf rein chemischer Aktion auf die Enzyme. Wässerige und glyzerinige Auszüge aus Hefe, welche reichlich Enzyme enthielten, filtrierte ich durch Porzellan, um vollkommen klare, zellfreie Lösungen zu erhalten. Fügt man einer solchen Lösung Milchsäure verschiedenster Konzentration zu, so entsteht ein starker, flockiger weißer Niederschlag. In dem Maße nun, als die Ausfällung unvollständig oder vollständig ist, wechselt die Intensität der verschiedenen enzymatischen Betätigungen der betreffenden Lösung; von ausfallenden Eiweißstoffen etc. scheinen die Enzyme mehr oder minder leicht und vollständig mitgerissen zu werden und ihre Aktivität zu verlieren. Das Sinken der letzteren habe ich in Bezug auf die Invertase und die Katalase eingehend untersucht. Es ist hiernach leicht verständlich, daß es mir gelang, nachzuweisen, daß z. B. die Selbstgärung der Preßhefe und des Zymins (Schroder) durch Zusatz freier Milchsäure vollständig unterdrückt werden kann, und daß auch die Vergärung von Glukose beträchtlich reduziert wird. So wurden z. B. zwei große Einhornsche Röhrchen mit derselben Zymins-Aufschwemmung beschickt, der in der einen Röhre (B) außerdem 5 cc 2% Milchsäure, in der andern (A) 5 cc Wasser zugefügt wurden. In A waren nach 22 Stunden 21 cc Kohlensäure

¹⁾ Hayduck, Chem. Centralbl. 86. 727. — Oesterr.-ung. Zeitschr. f. Zuckerind. etc. 11. 141.

²⁾ Märcker und Neale, Neue Zeitschr. f. Rübenzuckerind. 3. 213. — Loew, *ibid.* 16. 247. — Duclaux, Chem. Centralbl. 92b. 924.

³⁾ Dumas, Ann. de chim. et de phys. V. 3. 81. — Loew, Chem. Centralbl. 91b. 879. — Hausen, Chem. Centralbl. 93. 330.

⁴⁾ Kolbe u. Meyer, Journ. f. prakt. Chem. II. 9. 133.

⁵⁾ Servant, Compt. rend. 100. 1544.

⁶⁾ Heyden, Chem. Centralbl. 87. 1463.

⁷⁾ Böttinger, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 14. 67.

durch Selbstgärung gebildet, in B aber überhaupt kein Gas entwickelt worden ($T = 17^{\circ} C$). In gleicher Weise war bei Versuchen mit Preßhefe die Selbstgärung vollständig unterdrückt. Vergleichende Versuche mit Aufschwemmungen von Preßhefe und 10% Glukoselösung mit und ohne Milchsäurezusatz ergaben, daß 1% Milchsäurelösung¹⁾ das Volumen der entwickelten Kohlensäure etwa auf die Hälfte heruntersetzte.

5 g Preßhefe und 50 cc Wasser wurden zu ganz gleichmäßiger Aufschwemmung verarbeitet und damit Einhornsche Röhren gefüllt nach vorherigem Zusatz von je 5 cc 10%-Glukoselösung; alsdann wurde in der einen Hälfte der Röhren je 5 cc 1%-Milchsäure (B), in der anderen je 5 cc Wasser (A) zugefügt und nach sorgfältiger Mischung bei $17^{\circ} C$ stehen gelassen. In den A-Röhren war ungefähr das doppelte Volumen an Kohlensäure gebildet als in den B-Röhren.

Da, wie oben mitgeteilt, Säuren schon bei relativ sehr geringer Konzentration die Gärung hemmen, so lag die Vermutung nahe, daß auch die Milchsäure, weniger infolge ihrer chemischen Zusammensetzung, als infolge ihrer Acidität die Gärung erschwere resp. verhindere. Ich stellte nun ganz analoge Versuche mit Natriumlactat an und konnte konstatieren, daß in dieser Form die Milchsäure nicht nur nicht hemmend auf die Gärung einwirkte, sondern sogar selbst lebhaft vergoren wurde und zwar ebensowohl von Zymen als auch von Preßhefe und untergäriger Bierhefe.

Es wurden in einem Versuch mit Zymen und Natriumlactat in 2 Stunden 15 Minuten 15,6 cc Kohlensäure gebildet; nach Behandlung mit Kalilauge wurde alles Gas bis auf 0,4 cc, die also wohl Luft darstellten, absorbiert. Nunmehr wurden Parallelversuche mit Preßhefe in Einhornschen Röhren angestellt mit und ohne Natriumlactat-Zusatz, und zwar bei konstanter Temperatur von $30^{\circ} C$. Ich bereitete eine Aufschwemmung von 10 gm Preßhefe und 50 cc Wasser, füllte damit die Röhren und fügte zur einen Hälfte (A) je 5 cc Natriumlactatlösung, zur andern Hälfte (B) je 5 cc Wasser zu, um gleiche Verdünnungen zu erhalten. In den A-Röhren wurden während der Versuchszeit 8—9 cc Kohlensäure, in den B-Röhren 0,5—1 cc Kohlensäure (hier durch Selbstgärung) gebildet.

Bei einem weiteren Versuche mit untergäriger Bierhefe wurden die Röhren in drei Gruppen angeordnet und bei $30^{\circ} C$ sich selbst überlassen.

Gruppe A.	Hefeaufschwemmung	+	5 cc Natriumlactat-Lösung.
„	B.	„	+ 5 cc Wasser.
„	C.	„	+ 5 cc 1% Milchsäure.

Nach gleicher Zeit waren in den Röhren der Gruppe A 4,1—5 cc Kohlensäure, in denen der Gruppe B 0,5—0,8 cc dieses Gases, in denen der Gruppe C überhaupt kein Gas gebildet. Die Selbstgärung war bei C durch die Milchsäure vollständig unter-

¹⁾ Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß die hemmende Wirkung freier Milchsäure schon bei geringerer Konzentration beginnt, als oben angegeben ist.

drückt, in B entstand die geringe Menge Kohlensäure ausschließlich durch Selbstgärung, in A setzte sie sich aus Selbstgärungskohlensäure und aus der Vergärung des Natriumlactats entstammender zusammen.

Aus diesen Versuchen, die ich mehrfach wiederholte, ziehe ich zunächst folgende Schlüsse:

1. Freie Milchsäure kann weder von Zymin, noch von Preßhefe oder untergäriger Hefe vergoren werden.¹⁾
2. Freie Milchsäure in 1%-Lösung und in solchen höherer Konzentrationen verhindert die Selbstgärung lebender Hefe. Auch die Glukosevergärung wird durch freie Milchsäure in der angegebenen Konzentration stark herabgesetzt ev. ganz verhindert.
3. Natriumlactat wird durch Zymin, Preßhefe und untergärrige Bierhefe gut vergoren. Versuche mit eudiometrischer Volumenbestimmung der erzeugten Kohlensäure ergaben, daß die Vergärung der Milchsäure des Laktats eine annähernd vollständige war und auf Zusatz von neuem Natriumlactat aufs neue begann.

Durch Buchner und Meisenheimer wurde bei der Hefepreßsaft-Gärung das Auftreten kleiner Mengen von Milchsäure nachgewiesen, und das Verschwinden zugesetzter Milchsäure bei Anwendung anderer Hefepreßsäfte konstatiert. Durch meine Versuche ist nun auch die Fähigkeit lebender Hefe, Milchsäure als Alkalisalz zu vergären, nachgewiesen; Preßhefe des Handels, sowie rein gezüchtete Preßhefe als auch untergärrige Bierhefe vergären Natriumlactat. Die Versuche Buchners, Milchsäure mit Reinkulturen der Hefe 792 des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe, hatten negative Resultate ergeben und die Vermutung nahe gelegt, daß nicht die richtige Heferasse zur Anwendung gekommen war. In wieweit die Heferasse dabei eine Rolle spielt, werden weitere im Gange befindliche Versuche, auch mit anderen Salzen der Milchsäure, zeigen.

Die scheinbare Unvergärbarkeit der Milchsäure durch lebende Hefe war wohl die Veranlassung, zu erwägen, ob nicht andere Umwandlungsprodukte der Glukose auch bei der Gärung in Betracht zu ziehen seien. Methylglyoxal ($C_2H_4O_2$), das bei der Alkalisplaltung der Glukose entsteht (Nef), Glyzerinaldehyd resp. Glykolaldehyd und Formaldehyd (W. Loeb) wurden weiter als mögliche Durchgangsstadien angesprochen und dadurch vorübergehend die theoretischen Spekulationen in andere Bahnen gelenkt.

Buchner, der geniale Entdecker der zellfreien Gärung und der Zymase, der auch zuerst auf die intermediäre Bildung von

¹⁾ Nach den Untersuchungen von Wehmer (Centr. f. Bakt. II. X. 21. p. 628. 1903) greift keine der Formen von *Saccharomyces Brassicae* I—III, noch das *Bacterium Brassicae* die freie Milchsäure des Substrates in nachweisbarem Grade an, sodaß in rein gesäuerten Brühen keine Aciditätsabnahme stattfindet.

Milchsäure bei der Alkoholgärung hingewiesen hat, scheint letztere auch heute noch, wenn nicht als sichergestellt, so doch zweifellos als wahrscheinlich, beachtenswert und diskutabel zu betrachten, um so mehr, als einerseits die Spaltung der Glukose unter Bildung von Milchsäure relativ glatt mittels einfachster chemischer Mittel (z. B. durch Erhitzen mit Natronlauge) gelingt, und andererseits ja auch die Milchsäurebakterien den Traubenzucker mit beinahe theoretischer Ausbeute nach der Gleichung $C_6 H_{12} O_6 = 2 C_3 H_6 O_3$ zerlegen.

Durch die Milchsäurebildung zerfällt der Alkoholgärungsprozeß in zwei Phasen, zwei Enzyme arbeiten einander sozusagen in die Hände, das eine wandelt den Zucker in Milchsäure um, das andere zerlegt die Milchsäure in Kohlensäure und Alkohol. Buchner nennt das erste Enzym Zymase, das zweite Laktazidase. Die Zymase ist sicher ein Endoenzym; es ist niemals gelungen, sie aus der unverletzten Zelle herauszulösen; nur bei der Darstellung des Hefepreßsaftes gelangt die Zymase nach außen und nimmt teil an der „zellfreien Gärung“. Der Harden-Young'sche Gelatinefilter-Versuch, bei dem der Hefepreßsaft in zwei Teile zerlegt wird, einen Filtrerrückstand und ein Filtrat, von denen keiner für sich allein Zucker zu vergären vermag, die aber vereint den normalen Gärungsprozeß vollziehen, scheint mir zu der Annahme zu drängen, daß das Filtrat das eine der beiden bei der Gärung nötigen Enzyme enthält. Da nun aber keines der aus der unverletzten Hefe ausziehbaren Enzyme aus Natriumlactat Kohlensäure oder Alkohol zu bilden vermag, komme ich zu der Vermutung, daß die Milchsäure-Spaltung dem Endoenzym, der Zymase, zufällt, die Milchsäurebildung aber dem zum Teil wenigstens extrahierbaren, wasser- und glyzerinlöslichen Enzyme, der Katalase.

Wie ich in einer ausgedehnteren Abhandlung über die Katalase im Allgemeinen und die Hefekatalase im Besonderen an anderer Stelle mitteilen werde, herrscht unter den aus der unverletzten Hefezelle heraus lösbaren Enzymen die Katalase zweifellos vor, wenn sie auch außerdem in einer unlöslichen Form zum Teil in der Zelle verbleibt (α - und β -Katalase). Ich habe im Laufe meiner Beschäftigung mit diesem Enzym wässrige und Glyzerin-Auszüge aus verschiedenen Hefen herstellen können, welche soviel Katalase führen, daß sie bei Zusatz von nur wenig Wasserstoffsperoxyd momentan aufschäumen wie stark moussierender Champagner. Bestimmungen der Sauerstoffvolumina habe ich in genannter Abhandlung wiedergegeben. Die Katalase gehört zu den Oxydasen, sie gehört zu den Enzymen, welche wir an Wirkungen erkennen, welche sie, wie z. B. die Wasserstoffsperoxyd-Katalyse, bei normal atmenden Pflanzen vielleicht, bei der Hefe und anderen Pilzen aber wohl kaum zu entfalten vermögen.

Da mein Glyzerinauszug weder Laccase noch Peroxydase enthält, denn weder alkoholische Guajacölösung für sich noch mit Wasserstoffperoxyd gab eine Blaufärbung, so müssen die scharfen Oxydase-Reaktionen, die sich konstatieren lassen, wohl der Katalase zukommen. Wie die Laccase wirkt die Katalase auf viele Phenole,

so auf das zweiatomige Phenol Hydrochinon und das dreiatomige Phenol Pyrogallussäure. Mit Hydrochinon bilden sich Chinon und Chinhydron, und die Ausscheidung der goldgelben Kristalle des letzteren ist leicht unter dem Mikroskop zu beobachten. Mit Pyrogallol entstehen Purpurogallol-Kristalle, die man aus Äther leicht als gelbrote feine Nadelbüschel erhalten kann. Das Chinolinblau des Handels (Cyanin) wird entfärbt, Indigokarmin ebenso, nur viel langsamer. Guajacol, auf welches die Laccase in charakteristischer Weise einwirkt, läßt die Katalase unverändert. Dimethylparaphenylendiamin (1%) wird, besonders nach Zusatz von etwas Natriumkarbonat, durch Sauerstoffübertragung tief rotviolett gefärbt. Durch Wasserstoff entfärbtes Methylenblau wird rasch gebläut, ebenso Indigweiß. Die Katalase ist, wie ich an anderem Orte ausführlich mitteilen werde, reichlich in der Hefezelle enthalten. Da sie in zwei Formen auftritt, wasserlöslich und -unlöslich, kann sie gleichzeitig außerhalb und innerhalb der Zelle wirken. Die unlösliche α -Katalase kann man durch Behandlung mit Natriumkarbonat in die lösliche β -Katalase überführen; es ist nicht unwahrscheinlich, daß der Organismus die Fähigkeit besitzt, regulatorisch diese Umwandlung zu bewerkstelligen. Die Katalase ist gegen äußere Einflüsse auffallend widerstandsfähig und kommt in dieser Beziehung der Invertase nahe. Im trocknen Zustande ist sie sehr haltbar und kann sogar kurze Zeit auf 90—100° C ohne starke Schädigung erhitzt werden. Bei niedrigen Temperaturen getrocknete Hefe behält ebenso wie Acetondauerhefe, Zymin etc. ihre Wirkung unbeschränkte Zeit bei. Auf die Konsequenzen aus allen diesen Erscheinungen werde ich erst in meiner ausführlichen Abhandlung eingehen.

Man hat sich bisher vergeblich bemüht, für die Katalase der Hefe eine Funktion zu finden. Ich erblicke dieselbe auf Grund meiner bisherigen Untersuchungen in dem Abbau des Zuckers. Sie eröffnet die Glykolyse, indem sie den Traubenzucker in Milchsäure überführt.

Der erste, der eine physiologische Umwandlung verschiedener Zucker in Milchsäure beobachtete, war E. Fremy¹⁾; am 19. Juni 1839 machte er der Akademie der Wissenschaften in Paris die Mitteilung, daß es ihm gelungen sei, Zucker (und Milchzucker, Mannit, Dextrin) durch Berührung mit mehreren tierischen Membranen und besonders mit mit destilliertem Wasser gewaschenem Kalbsmagen, in Milchsäure umzuwandeln, so zwar, daß sich derselbe Versuch mit der nämlichen Membran unzählige Male wiederholen ließ. Entweder enthielt hier als wirksamen Stoff das Gewebe selbst ein oxydatisches Enzym, oder aber es waren Milchsäurebakterien, welche ein solches erzeugten. 1857 erhielt in der Tat Pasteur²⁾ zuerst Stäbchenbakterien als Erreger der Milchsäure-

¹⁾ Liebigs Ann. d. Pharm. 31. 1839. p. 188.

²⁾ Pasteur, L., Compt. rend. 45. 1857. p. 913. — 47. 1858. p. 224. — 48. 1858. p. 337. — 52. 1861. p. 344.

Gärung. Die ersten Reinkulturen erzielte 1877 Lister¹⁾. Daß es sich bei der Überführung des Zuckers in Milchsäure um eine Enzymtätigkeit handelt, bewiesen neuerdings Buchner und Meisenheimer²⁾ durch Versuche, nach denen der „Acetondauerhefe“ analoge Präparate aus *Bacillus Delbrückii* Leichm. Zucker zu Milchsäure vergoren; ein ähnliches Dauerpräparat stellte Herzog³⁾ dar, und aus Preßsäften von tierischen Organen gewann Stocklasa⁴⁾ ein Milchsäure produzierendes Enzym. Auch für die Zersetzung des Zuckers im tierischen Stoffwechsel nahm man seit längerer Zeit Oxydase in Anspruch; ich verweise hier nur auf die Arbeiten von N. Sieber⁵⁾, durch welche die Lehre von der „Glykolyse“ im Blute wieder an Boden gewann, sowie auf die wichtigste unten zitierte Literatur.⁶⁾

Alle die in oben angeführten Untersuchungen verwendeten tierischen Gewebe, das Blut, die Bakterien, welche Milchsäure zu bilden vermögen, sind erfahrungsgemäß katalasehaltig. Da nun unter den Oxydase der Hefe die Katalase nachweislich dominiert und wir von einer anderweiten Funktion derselben nichts wissen, kann es nur als folgerichtig erscheinen, wenn wir sie in den Dienst des Zuckerabbaus stellen.

Was nun zunächst den Nachweis der in gewöhnlichen Gärflüssigkeiten entstehenden Milchsäure anbelangt, so bietet derselbe keine besonderen Schwierigkeiten. Ich brachte in die gärende Flüssigkeit Zinkoxyd oder Calciumkarbonat, filtrierte nach vollendeter Gärung durch Porzellankerzen, dampfte vorsichtig zur Trockne ein, löste in Alkohol und erhielt nach kurzem Stehenlassen ev. unter Zuhilfenahme von Äther die charakteristischen Kristallformen einmal des Zinklactats, das andere Mal des Calciumlactats.

Nunmehr schritt ich zum Nachweis der Milchsäurebildung in Traubenzuckerlösungen mit Hilfe der wässerigen und glyzerinigen Auszüge aus Preßhefe, Zymin, untergäriger Hefe etc. Das durch Porzellan filtrierte Extrakt wurde mit 10% Glukoselösung und mit Zinkoxyd und Calcium-Karbonat versetzt und längere Zeit bei 18° C sich selbst überlassen. Die Menge der zugesetzten Glukoselösung wurde vielfach geändert, ebenso die Temperatur und Dauer der Versuche. Zur Sterilhaltung wurde Thymol verwendet, was sich bei meinen Pariser Versuchen mit Invertaselösungen vorzüglich

¹⁾ Lister, Quart. Journ. Micr. Science. 13. 1873. p. 380. — Phil. Trans. 1877—78. Pharm. Journ. 1877. p. 285.

²⁾ Buchner, E. u. Meisenheimer, J., Ber. d. chem. Ges. 36. 1903. p. 634.

³⁾ Herzog, R. O., Zeitschr. f. physiol. Chem. 37. 1903. p. 381.

⁴⁾ Stocklasa, J., Jelinek und Cerny, Centralbl. f. Physiol. 16. 1902. p. 713.

⁵⁾ Sieber, N., Zeitschr. f. physiol. Chem. 39. 1903. p. 484.

⁶⁾ Spitzer, W., Pflüg. Arch. 67. 1897. p. 615. — Jacoby, Virchows Arch. 157. 1899. p. 235. — Umber, F., Zeitschr. f. klin. Med. 39. 1900. p. 13. — Sentner, G., Zeitschr. f. phys. Chem. 44. 1903. p. 257. — Proceed. Roy. Soc. 74. 1904. p. 201. — Loew, O., Pflüg. Arch. 100. 1903. p. 332. — Euler, H., Ark. för Kemi. I. 1904. p. 329. 357. — Reiß, C., Zeitschr. f. klin. Med. 56. 1905. Heft 1.

bewährt hatte. Dann wurde vom Bodensatz abgegossen, eingedampft, in Alkohol gelöst, filtriert und mit oder ohne Äther zur Kristallisation gebracht. Ich konnte auch hier deutlich Zink- resp. Calciumlactat in charakteristischen Kristallen erhalten. Es war also durch das katalasereiche Extract Milchsäure aus Glukose gebildet worden. Auch verschiedene Milchsäure-Reaktionen gaben positives Resultat, so die Uffelmannsche Eisenchlorid-Phenol-Reaktion bei sicherer Abwesenheit von Alkohol etc.

Das allmähliche Verschwinden der Glukose aus der Versuchsflüssigkeit habe ich unter Anwendung der Bertrand'schen Methode nachgewiesen. Alle drei Stunden wurden gleiche Volumina mit denselben Wassermengen verdünnt und mit gleichen Mengen Fehling'scher Lösung durch 10 Minuten langes Kochen reduziert, und das Kupfer mit Permanganatlösung von bekanntem Titer bestimmt. Der Zucker nahm stets in gleichmäßigem Tempo ab und war nach wenigen Tagen unter den obwaltenden Versuchsbedingungen vollständig verschwunden. Ich habe diesen Versuch öfters wiederholt, immer mit dem gleichen Resultate. Ein in meinem Glyzerinauszuge enthaltenes Enzym ist hiernach imstande, den Traubenzucker in Milchsäure zu zerlegen und ich mache, bevor es mir oder Anderen nicht gelingt, anderes nachzuweisen, vorläufig die Katalase, an welcher der Auszug besonders reich ist, dafür verantwortlich.

Den Modus der Glukosezerlegung zu erkennen, war mir vorläufig nicht möglich; es bleibt einstweilen unentschieden, ob der Traubenzucker wie durch das Enzym der Milchsäurebakterien glatt in zwei Moleküle Milchsäure zerfällt nach der Gleichung



oder ob die Zerlegung unter Kohlensäure- und Wasserbildung vor sich geht entsprechend der Gleichung

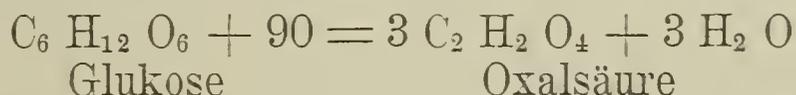


Eine Kohlensäureentwicklung in Form von Blasen konnte ich jedenfalls nicht beobachten, trotzdem die Flüssigkeit schwach sauer reagierte, eine sofortige Absorption der etwa entstehenden Kohlensäure also ausgeschlossen war. Die Möglichkeit des zweiten Zerlegungsmodus kam nur deshalb in Frage, weil O. Loew¹⁾ seinerzeit einen Versuch anstellte, bei dem er Glukose in Berührung mit der α -Katalase des Tabaks unter Kohlensäurebildung verschwinden sah. Er bestimmte die produzierte Kohlensäure nach Absorption derselben durch Barytwasser titrimetrisch. Unter dem Einflusse von β -Katalase derselben Versuchspflanze konnte er eine Glukoseabnahme mittels Fehling nicht konstatieren. Ich stellte deshalb mit meinen Glyzerinauszügen aus der Hefe Vorversuche an, welche zunächst erkennen ließen, daß Kohlensäure gebildet wird. Nach vollständiger Vertreibung der Kohlensäure aus den Versuchskölbchen durch einen entkohlensäurten Luftstrom wurde nach einiger Zeit

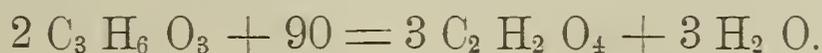
¹⁾ Loew, O., l. c. p. 40 u. 41 des S. A.

vorgelegtes Barytwasser deutlich getrübt. Quantitative Versuche hierüber sind noch im Gange; soweit ich die bisher erhaltenen Resultate übersehe, entspricht die Menge entwickelter Kohlensäure nicht der des zersetzten Zuckers. Der Zucker wird also nur unvollständig oxydiert, die Acidität der Versuchsflüssigkeit nimmt stetig zu, wie wir gesehen haben, entsteht neben Kohlensäure Milchsäure. Hahn¹⁾ führte analoge Versuche mit dem Preßsaft des Kolbens von *Arum maculatum* mit ähnlichem Resultate aus und M. Scheel²⁾ mit Glyzerinauszügen aus Erbsenkeimlingen und Zuckerrüben. Leider enthielten die Scheelschen Versuchslösungen, wie er selbst hervorhebt, mehrere Oxydasen nebeneinander; zweifellos hatte er neben der eigentlichen Oxydase und der Peroxydase auch β -Katalase in der Lösung und es bleibt daher unbestimmt, welcher dieser Oxydasen die Zuckerzersetzung zuzuschreiben ist. In meinen Hefeauszügen, die weder mit noch ohne Wasserstoffperoxyd eine Oxydation der Guajakonsäure vollziehen, kommt also sicher nur die Katalase in Frage.

Es sei gleich hier bemerkt, daß sich bald nach Zusatz der Glukose zum Glyzerinextrakt in der spiegelklaren gelblichen Lösung glitzernde Kristalle an der Wand und auf dem Boden der Glaskölbchen absetzten. Ich hielt die Kristalle zunächst für Kaliumphosphat aus der Hefe. Da sie sich aber in den unter ganz gleichen Verhältnissen befindlichen, filtrierten Glyzerinextrakten ohne Zuckerzusatz nicht einstellten, erregten sie mein Interesse und ich machte mich an ihre genauere Untersuchung. Die negativen Resultate der Prüfung mit Silbernitrat, Magnesiamischung und Ammoniummolybdat lehrten, daß es sich nicht um ein Phosphat handeln konnte;³⁾ vielmehr ließ sich aus dem Verhalten gegen lösliche Kalksalze, übermangansaures Kali, Goldchlorid etc. und aus dem mikroskopischen Verhalten auf Oxalsäure schließen, und zwar auf saures Kaliumoxalat. Die Oxalsäure war demnach aus dem Traubenzucker hervorgegangen; Hefe vermag bekanntlich auch aus Glyzerin Oxalsäure zu bilden; wäre das hier der Fall gewesen, so müßte aber die Säure auch im glukosefreien Glyzerinextrakt, den ich absichtlich zu diesem Zwecke oft lange Zeit unter besonders günstigen Verhältnissen stehen ließ, einmal gebildet worden sein, was nicht der Fall war. Unter dem Einfluß eines oxydierenden Enzymes, wie der Katalase, ist die Bildung von Oxalsäure aus Glukose leicht vorstellbar nach der Gleichung:



oder es tritt auch hier eine Zwischenbildung von Milchsäure ein, die sich dann erst in Oxalsäure umsetzt:

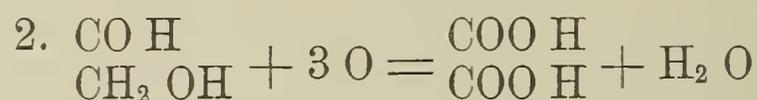
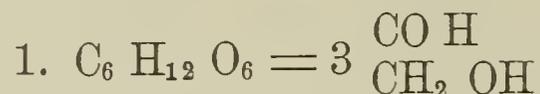


¹⁾ Hahn, Chem. Ber. Bd. 33. p. 3555.

²⁾ Scheel, M., Pflanzenphysiol. Unters. In.-Diss. Kiel 1902. p. 37.

³⁾ Gelegentlich scheiden sich auch kleine Kriställchen von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia aus, die an ihren Reaktionen leicht zu erkennen sind.

Ich verzichte hier darauf, andere Bildungsmöglichkeiten für die Oxalsäure zu diskutieren; erwähnen will ich nur, daß nach den neueren Untersuchungen von Paul Mayer¹⁾ über die Kondensation von Glycolaldehyd zu Traubenzucker im tierischen Körper auch umgekehrt eine intermediäre Zerlegung des Traubenzuckers in diesen Aldehyd und darauffolgende Oxydation des letzteren zu Oxalsäure nach den Gleichungen



in Betracht zu ziehen wäre.

Das Auftreten von Oxalsäure bei der Alkoholgärung ist bekannt; man findet dieselbe, wenn auch meist in geringer Menge, in Form von Calciumoxalat in der Gärflüssigkeit. In seltenen Fällen (Paul Lindner) wurde sogar eine deutliche Biertrübung durch oxalsauren Kalk beobachtet. Viel mehr als die Hefe neigen die Schimmelpilze zur Oxalsäure-Produktion, wenn auch einzelne Hefen, wie z. B. der von Zopf²⁾ direkt als „Oxalsäuregärer“ bezeichnete und im Baumwollensaatmehle entdeckte *Saccharomyces Hansenii*, in dieser Beziehung von Schimmelpilzen kaum übertroffen werden kann.

Soweit ich diese interessante Frage nach der Oxalsäurebildung hier in meinen zellfreien Enzymlösungen bis jetzt übersehe (ich bin in die eingehende Untersuchung derselben bereits eingetreten und behalte mir dieses Spezialgebiet vor), sind, wie es scheint, alle Oxalsäurebildner zymasearm und oxydasereich; sie produzieren vermutlich Milchsäure auf enzymatischem Wege, können dieselbe aber aus Mangel an Zymase nicht zu Alkohol und Kohlensäure zerlegen, sondern oxydieren sie, zum Teil wenigstens, zu Oxalsäure weiter.

In meinen oben angeführten Versuchen ist es mir zunächst gelungen, die durch ein von der Zelle abgetrenntes Hefeenzym aus Glukose erzeugte Milchsäure dem abbauenden Einflusse der Zymase zu entziehen und durch weitere Einwirkung jenes oxydatischen Enzyms extra cellulam in Oxalsäure umzuwandeln. Wie ich in einer späteren Mitteilung darlegen werde, werfen diese Beobachtungen auch ein orientierendes Licht auf einen Entstehungsmodus der Oxalsäure in höheren Pflanzen.

Das Gelingen des Versuches, Glukose bez. Milchsäure mit Hilfe einer aus der Hefe isolierten Oxydase außerhalb der Zelle in Oxalsäure umzuwandeln, drängt nun weiter die Frage auf, ob zu beiden Oxydationsvorgängen ein und dasselbe Enzym befähigt ist, oder ob dazu verschiedene Enzyme nötig sind. Trifft die erste Annahme zu, so würde darin eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür

¹⁾ Mayer, Paul, Zeitschr. f. physiol. Chem. 38. 1903. 135.

²⁾ Zopf, W., Ber. d. Bot. Ges. Bd. VII. 1889. p. 94.

liegen, daß die Milchsäurebildung nach der zweiten der oben angegebenen Gleichungen verläuft.¹⁾

Es wird eine weitere dankbare Aufgabe sein, zu untersuchen, ob auch andere der Alkoholproduktion unfähige oder in diesem Sinne nur sehr schwach arbeitende Pilze wie unter den Hefen die *Pichia membranaefaciens*, viele *Torula*-Arten, und unter den Schimmelpilzen einzelne *Mucor*- und *Aspergillus*-Arten, soweit sie Oxydasen enthalten, als zu den Oxalsäuregärern gehörig erwiesen werden können. Vom *Aspergillus niger* wissen wir bereits, daß er einer der lebhaftesten Oxalsäurebildner ist und bis zur Hälfte des ihm gebotenen Zuckers an Oxalsäure produzieren kann; wir wissen auch, daß die Alkoholbildung durch *Mucor*- und *Aspergillus*-Arten sich in bescheidenen Grenzen hält.

Kehren wir nach diesen Auseinandersetzungen nochmals zu dem Harden-Young'schen Gelatinefilter-Versuche zurück, so wird dessen Interpretation an der Hand der gewonnenen Erfahrungen wesentlich erleichtert. Der Filterrückstand enthält von beiden für die Gärung nötigen Enzymen in der Hauptsache nur das eine, die Zymase, das Filtrat nur das andere, die Katalase, denn man wird annehmen dürfen, daß unter derartigen Verhältnissen (zerriebene Zellen) auch die α -Katalase größtenteils in Lösung geht. Eins dieser beiden Enzyme kann ohne das andere Zucker nicht vollständig vergären, weil jedes von ihnen nur eine der beiden Phasen des Prozesses vollzieht. Bringen wir aber inaktiven Filterrückstand mit inaktivem Filtrat zusammen, so kann die Zuckervergärung normal verlaufen. Die Untätigkeit des isolierten Filtrates ist wahrscheinlich nur eine scheinbare, es wird Zucker zu Milchsäure vergären, aber man sieht nichts davon, sondern muß eben die gebildete Milchsäure nachweisen, wie es oben nach Anwendung der Auszüge geschehen ist. Auch der andere der Harden-Young'schen Versuche findet nunmehr seine Erklärung; nach ihm kann die Gärkraft des Hefepreßsaftes durch Zusatz von sogen. „Kochsaft“, d. h. aufgekochtem, selbst nicht mehr gärkräftigen Preßsaft gesteigert, und ein Preßsaft, der infolge ausgeübter Gärwirkung seiner Gärkraft ganz verlustig gegangen ist, durch Zusatz von Kochsaft zu neuer Gärtätigkeit angeregt werden. Zweifellos ist im ausgegorenen Preßsaft die Zymase noch vorhanden, aber die, wie es scheint, unter den obwaltenden Verhältnissen empfindlichere Katalase zu sehr geschwächt. Der Kochsaft, durch dessen Zugabe die unterbrochene Gärtätigkeit wieder in Gang kommt, enthält kein intaktes Enzym mehr, aber viel Phosphor, denn ich konnte nachweisen, daß die möglichst gereinigte Katalase weder Mangan noch Eisen, aber reichlich Phosphor enthält; es wird also wohl durch den im Kochsaft in irgend welcher Form, ev. in Form eines organischen, verseifbaren Phosphorsäureesters (Buchner) enthaltenen Phosphor die Katalase wieder regeneriert, und damit die

¹⁾ Eine ähnliche Zuckerzerlegung beobachtete E. Weinland (Zeitschr. f. Biol. Bd. 42. 1901. p. 55. — Bd. 43. 1902. p. 86. — Bd. 45. 1904. p. 113) durch eine Oxydase von *Ascaris lumbricoides*, die den Zucker in Kohlensäure und Valeriansäure überführt.

Zusammenarbeit der beiden Enzyme wieder ermöglicht. Das hypothetische „Ko-Enzym“ ist wahrscheinlich ein phosphorhaltiger Teil der Katalase; zur Regeneration der letzteren ist Phosphorsäurezufuhr nötig, daher die enorme Steigerung der Gärtätigkeit mit Kaliumphosphat lagernder Hefe, die in letzter Linie möglicherweise auf Katalasevermehrung beruht. Der Gehalt von Hefe und Gärflüssigkeit an Phosphorsäure, die Phosphorsäure-Bilanz während des Gärungsprozesses wird man daher in Zukunft genauer verfolgen, und die Isolierung der Zymase, ihre Befreiung von anderen die Beobachtung störenden Substanzen erstreben müssen. Bewährt sich in Zukunft die von mir hier vorgetragene Auffassung, dann haben wir nach der v. Lippmannschen Nomenklatur in der Katalase eine Glukolactazidase, in der Zymase eine Lactazido-Alkoholase vor uns.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Botanisches Centralblatt](#)

Jahr/Year: 1909

Band/Volume: [BH_25_1](#)

Autor(en)/Author(s): Kohl Friedrich Georg

Artikel/Article: [Über das Wesen der Alkoholgärung. 115-126](#)