

Ueber alkoholische Gährung. I.

Von

R. O. Herzog.

(Begonnen am II. chem. Univers.-Laboratorium in Wien, beendet in Heidelberg.)

(Der Redaction zugegangen am 19. November 1902.)

E. Buchner hat bekanntlich bewiesen, dass die alkoholische Gährung ein vom Leben der Hefezelle trennbarer, ein enzymatischer Vorgang ist. Der Nachweis ist auf zwei Wegen erbracht worden. Einmal wurden die Zellen mechanisch¹⁾ zerstört und gefunden, dass der Zellsaft Zucker zu spalten vermag; zum Zweiten wurde gezeigt, dass in Zellen, die mit geeigneten chemischen Mitteln (Wasserentziehung durch Erwärmen,²⁾ Behandlung mit Alkohol und Aether,³⁾ mit Aceton⁴⁾ getödtet waren, die Zymase in wirksamem Zustand erhalten blieb.

Es war ein dritter Weg für den Nachweis möglich, ob die Gährung ein enzymatischer Process sei: der Vergleich der Gesetze des vom Leben der Zelle losgelösten Vorganges mit den bereits für einige Fälle der Fermentwirkung festgestellten.⁵⁾

1) Vgl. E. Buchner, Ber. d. chem. Gesellsch., Bd. 30, S. 117, 1110, 2668 (1897), Bd. 31, S. 568, 1090, 1531 (1898).

2) E. Buchner, Ber. d. chem. Gesellsch., Bd. 30, S. 1112 (1897).

3) R. Albert, Ber. d. chem. Gesellsch., Bd. 33, S. 3775 (1900).

4) R. Albert, E. Buchner u. R. Rapp, Ber. d. chem. Gesellsch., Bd. 35, S. 2376 (1902).

5) Vgl. Tammann, Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. 3, S. 25 (1889), Bd. 18, S. 426 (1895). Diese Zeitschr., Bd. XVI, S. 271 (1892). O'Sullivan u. Tompson, Journ. chem. Soc. Trans., Bd. 57, S. 834 (1890). Henri, Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. 39, S. 194 (1901). E. Fuld, Beitr. d. chem. Phys., Bd. II, S. 169 (1902) u. a. Ferner E. Duclaux, Traité de Mikrobiologie, Bd. II (1899). G. Bredig, Anorg. Fermente (1901). Höber, Physikal. Chemie der Zelle, 1902.

Vor Kurzem haben R. Albert, E. Buchner und R. Rapp¹⁾ eine Methode beschrieben, Hefe mit Aceton zu tödten und durch weitere geeignete Behandlung ein recht bequem zu verwendendes Präparat — «Zymin»²⁾ — zu gewinnen. Dasselbe ist staubtrocken und kann leicht durch inniges Mischen von durchaus gleichmässiger Wirksamkeit erhalten werden; es ist ferner ziemlich activ und bewahrt seine Gährkraft ungeschwächt durch einige Zeit. Freilich besitzt man in dem Präparat kein irgendwie «gereinigtes» Ferment, im Gegentheil verschwindet die Zymase — wie sich auch im Folgenden zeigt — in Lösung ziemlich bald, wohl durch die proteolytischen Enzyme der Hefe zerstört (Buchner). Es kommt ferner in Betracht, dass eine Summe von Substanzen in Lösung geht, die absolut uncontrollirbaren Einfluss üben. Dass endlich verschiedenen Zyminpräparaten, von allem Andern abgesehen, ganz verschiedene Fermentmengen zukommen und nur Resultate, die mit demselben Präparat erhalten wurden, vergleichbar sind, bedarf wohl keiner Erwähnung.

Aus einigen Gründen wäre es für die folgenden Versuche möglicher Weise vorzuziehen gewesen, aus Presssaft das Ferment mit den Eiweissstoffen (etwa durch Alkohol und Aether)³⁾ niederzuschlagen und mit dem gefällten Product zu arbeiten. Insbesondere wäre man auf diese Art vielleicht dem Fehler entgangen, der durch die Selbstgährung der Hefe gegeben ist. Diese zeigt das Zymin besonders in der ersten Zeit relativ ziemlich stark, wie ich mich durch einige Versuche überzeugt habe. (Auf die Selbstgährung ist wohl zum Theil auch zurückzuführen, dass in der allerersten Zeit der Einwirkung k mitunter zu gross ist.⁴⁾ Immerhin schien mir bei den verwendeten ziemlich hohen Zuckerconcentrationen die durch Glycogenspaltung gebildete Kohlensäuremenge kaum sehr in Betracht zu kommen. Auch Erwägungen anderer Art, auf die in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden soll, sprachen für die

1) l. c.

2) Käuflich bei A. Schroder-München.

3) R. Albert u. E. Buchner, Ber. d. chem. Gesellsch., Bd. 33, S. 266, 971 (1900).

4) Vgl. auch Ber. d. chem. Gesellsch., Bd. 35, S. 2381 (1902).

Zulässigkeit, das glycogenhaltige Präparat zu verwenden. Doch soll schon hier erwähnt werden, dass nach dem Verschwinden der Selbstgährung auch ziemlich concentrirte Zuckerlösungen nicht mehr angegriffen wurden. Von der Anwesenheit des Sauerstoffs war die Selbstgährung unabhängig.

Der Einwand der Undurchlässigkeit der Zellwand für das Ferment schien mir bei der leichten Permeabilität für Zucker nicht genügend stichhaltig. Weder Concentration noch Homogenität des Mediums sind dadurch gestört.

Die im Folgenden beschriebenen Versuche sind also mit käuflichem Zymin durchgeführt. Es soll sofort bemerkt sein, dass sie nur eine vorläufige Orientirung über das Gebiet bezwecken. Versuche mit vielleicht einwandfreierer Anordnung sollen bei günstigerer Gelegenheit angestellt werden.¹⁾

Es wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Spaltung von Traubenzucker und Lävulose bei Gegenwart von Zymin gemessen.

Als Maass des Fortschrittes der Reaction war die Bestimmung der bei der Gährung frei werdenden Kohlensäure vorzüglich geeignet. Das entwickelte Gas wurde aus dem Reactionsgefäss durch einen Luftstrom verdrängt und nach Trocknung im Kaliapparat absorbirt. Das Durchsaugen²⁾ eines Luftstromes durch den Apparat brachte auch den Vortheil der constanten Rührung im Reactionsgefäss, was bei den zähen Eiweisslösungen wesentlich ist; ausserdem wurde eine Uebersättigung mit Kohlensäure vermieden.

Hier soll auch gleich erwähnt werden, dass das Zymin, wie die Verfasser³⁾ mittheilen, sterilisirende Wirkung besitzt.

1) Ich bitte die Fachgenossen, mir das Gebiet noch eine Weile überlassen zu wollen.

2) Die Geschwindigkeit des Luftstromes hat einen — übrigens ganz geringen — Einfluss auf die Menge der gewonnenen Kohlensäure, sie wurde im allgemeinen möglichst gleichmässig regulirt.

3 l. c.

Ich habe mich mitunter überzeugt, dass selbst bei längerer Einwirkung nur verhältnissmässig wenig Bacterien sich vorfanden, die weiter keinen Einfluss nehmen konnten. Es war also möglich, trotz der tagelangen Dauer der Versuche, von dem fermenteschädigenden Zusatz eines Antisepticums abzusehen.

Hiermit ergab sich etwa folgende Versuchsanordnung:

Eine gewogene Menge Zymen wurde in einem Fraktionirkölbchen von 30 ccm Inhalt mit 10 ccm Zuckerlösung gut gemischt. Das Kölbchen war mit einem Kautschukstopfen verschlossen, durch dessen Bohrung ein Glasrohr bis fast an den Boden des Gefässes ging. Die durchgesaugte Luft war zuerst durch Kalilauge von Kohlensäure befreit worden und passirte dann einen Kaliapparat, welcher mit Wasser gefüllt war und in demselben Ostwald'schen Thermostaten stand, wie das Reactionsgefäss. Durch diese Anordnung konnte die Abnahme der Concentration, die durch den constanten Luftstrom hervorgerufen war, wieder annähernd ausgeglichen werden. Das Gas passirte nach dem Reactionsgefäss concentrirte Schwefelsäure, um von Wasser und Alkohol befreit zu werden, hierauf den Kaliapparat und endlich ein Natronkalkrohr. Die Tabellen zeigen die Summe der Gewichtszunahme in diesen beiden Apparaten an.

Hier soll auch gleich bemerkt werden, dass immer Parallelversuche angestellt wurden.

Die Versuche wurden meist dann abgebrochen, wenn eine ziemlich erhebliche Veränderung der Constanten (k) auf Abnahme an Ferment hinwies.¹⁾

Bevor summarische Ergebnisse mitgetheilt werden,²⁾ soll über die angewandten Concentrationen noch gesagt sein, dass nach einigen Vorversuchen eine etwas höher als normale

¹⁾ Diese erklärt sich möglicher Weise so, dass die Fermente zunächst in der Zelle geschützt eingelagert sind. Nach einer gewissen Zeit wird dieser Schutz — bei der Autophagie — zerstört.

²⁾ Auch für die im Folgenden mitgetheilten Tabellen gilt das Gesagte; sie sollen zunächst nur zur vorläufigen Orientirung dienen; ausführlicheres Zahlenmaterial soll später mitgetheilt werden.

Zuckerconcentration und 1,2 g Zymin pro 10 ccm Lösung sich als recht brauchbares Verhältniss erwiesen hatte. Die Zuckerlösung wurde daher meist so hergestellt, dass 20,45 g (= 1,136 normal) krystallwasserfreier Traubenzucker in 100 ccm gelöst waren; das gibt für Kohlensäure als Anfangsconcentration rechnerisch sehr bequem $a = 1$ g.

In den Tabellen enthält Kolumne t die Zeit zwischen den Wägungen in Minuten, Kolumne $a-x$ die in den zugehörigen Zeiten bestimmten Concentrationen, Kolumne 0,4343 k die für eine monomolekulare Reaction berechnete Geschwindigkeitsconstante ($0,4343 k = \frac{1}{t} \lg \frac{a}{a-x}$), Kolumne 0,4343 k' die nach der von Henri¹⁾ für die Invertase geltende Gleichung bestimmte Geschwindigkeitsconstante ($0,4343 k' = \frac{1}{2t} \lg \frac{a+x}{a-x}$).

Traubenzucker.

Tab. Ia.

Concentration: 1,136 norm. ($a = 1$); 1,2 g Zymin. Temperatur: 24,5°.

t	a-x	0,4343 k	0,4343 k'
120	0,961	0,000144	0,000141
240	0,922	0,000147	0,000141
1200	0,673	0,000143	0,000123
1440	0,612	0,000148	0,000123
1740	0,549	0,000149	0,000121
2690	0,396	0,000149	0,000120
3000	0,354	0,000150	0,000111

1) V. Henri, Ueber das Gesetz der Wirkung des Invertins. Zeitschrift f. physik. Chem., Bd. 39, S. 194 (1901).

Tab. Ib.¹⁾Concentration: 1,136 ($a = 1$); 1,2 g Zymin. Temperatur: 24,5°.

t	a—x	0,4343 k	0,4343 k'
120	0,961	0,000144	0,000141
240	0,931	0,000129	0,000133
1200	0,687	0,000137	0,000117
1440	0,627	0,000140	0,000118
1740	0,560	0,000145	0,000117
2690	0,403	0,000146	0,000111
3000	0,365	0,000146	0,000108
4140	0,271	0,000137	0,000099

Tab. II.

Concentration: 0,568 norm. ($a = 0,5$); 1,2 g Zymin. Temperatur: 24,5°.

t	a—x	0,4343 k	0,4343 k'
240	0,409	0,000363	0,000333
420	0,349	0,000374	0,000315
1440	0,142	0,000379	0,000274
1740	0,119	0,000359	0,000249

Tab. IIIa.²⁾Concentration: 1,704 norm. ($a = 1,5$); 1,8 g Zymin. Temperatur: 24,5°.

t	a—x	0,4343 k	0,4343 k'
120	1,452	0,000117	0,000117
240	1,407	0,000116	0,000112
540	1,289	0,000122	0,000113
1440	0,962	0,000134	0,000113
3000	0,554	0,000144	0,000106
4200	0,461	0,000122	0,000088

1) Parallelversuch.

2) Ein Versuch mit der Conc. 0,568 norm. ($a = 0,5$); Zymin 0,6 g, 24,5° zeigte fast gar keine Gährung.

Tab. IIIb.¹⁾

Concentration: 1,704 norm. (a = 11,5); 1,8 g Zymin. Temperatur: 24,5°.

t	a—x	(0,4343 k	0,4343 k'
120	1,455	0,000111	0,000108
240	1,411	0,000110	0,000107
540	1,286	0,000123	0,000115
1440	0,943	0,000140	0,000117
3000	0,574	0,000139	0,000104
4200	0,473	0,000119	0,000087

Tab. IV.

Concentration: 0,89 norm. (a = 0,978 g in 12,5 ccm); 1 g Zymin.
Temperatur 24,5°.

t	a—x	(0,4343 k	0,4343 k'
120	0,955	0,000086	0,000085
500	0,884	0,000087	0,000083
1280	0,741	0,000098	0,000084
1580	0,690	0,000096	0,000083
1960	0,633	0,000097	0,000081
2700	0,549	0,000093	0,000075
3060	0,502	0,000094	0,000075

Tab. V.

Concentration: 0,89 norm. (a = 0,978 g in 12,5 ccm); 2 g Zymin.
Temperatur 24,5°.

t	a—x	0,4343 k	0,4343 k'
260	0,844	0,000246	0,000230
500	0,654	0,000349	0,000299
2100	0,195	0,000333	0,000227
2340	0,170	0,000325	0,000218
3120	0,114	0,000299	0,000199
3780	0,060	0,000304	0,000199
4500	0,033	0,000327	0,000196

¹⁾ Parallelversuch.

Tab. VI.

Concentration: 1,78 norm. ($a = 1,956$ in 12,5 ccm); 2 g Zymin. Temperatur 24,5°.

t	a—x	0,4343 k	0,4343 k'
180	1,881	0,000090	0,000092
870	1,577	0,000107	0,000098
1050	1,489	0,000112	0,000100
1170	1,424	0,000118	0,000103
1290	1,353	0,000124	0,000107
2180	1,041	0,000125	0,000101
2840	0,831	0,000130	0,000102
3620	0,674	0,000126	0,000094

Tab. VII. ¹⁾

Concentration: 1,78 norm. ($a = 1,956$ in 12,5 ccm); 2 g Zymin. Temperatur: 24,5°.

t	a—x	0,4343 k	0,4343 k'
80	1,914	0,00018	0,000113
200	1,849	0,000122	0,000118
340	1,774	0,000124	0,000119
460	1,749	0,000104	0,000100
610	1,686	0,000105	0,000098
1270	1,412	0,000111	0,000099
1450	1,313	0,000119	0,000102
1810	1,147	0,000128	0,000105
2700	0,887	0,000130	0,000098
3360	0,713	0,000130	0,000097
4140	0,650	0,000115	0,000084

¹⁾ Parallelversuch.

Tab. VIII.

Concentration: 1,136 norm. ($a = 1$ in 10 ccm); 1,2 g Zymin. Temperatur: 28,5°.

t	a—x	0,4343 k	0,4343 k'
120	0,952	0,000178	0,000173
460	0,823	0,000184	0,000144
1260	0,586	0,000184	0,000151
1560	0,521	0,000181	0,000145
1860	0,473	0,000175	0,000137

Tab. IX.¹⁾

Concentration: 1,136 norm. ($a = 1$); 1,8 g Zymin. Temperatur: 28,5°.

t	a—x	0,4343 k	0,4343 k'
90	0,928	0,000360	0,000348
300	0,761	0,000395	0,000337
930	0,374	0,000459	0,000343
1100	0,319	0,000451	0,000311
1340	0,299	0,000391	0,000281

Tab. X.²⁾

Concentration: 1,136 norm. ($a = 1$); 0,6 g Zymin. Temperatur: 28,5°.

t	a—x	$a_1 - x_1$	0,4343 k	0,4343 k'
100	0,986	0,986	0,000061	0,000060
340	0,964	0,966	0,000047	0,000046
1000	0,919	0,919	0,000037	0,000035
1420	0,874	0,872	0,000041	0,000038
2350	0,839	0,840	0 000032	0,000030

1) Die ziemlich unregelmässigen Zahlen sind wohl durch die hohe Fermentconcentration bei ziemlich hoher Temperatur zu erklären.

2) Dieser anscheinend sehr unregelmässige Versuch sei (mit dem Parallelversuch) mitgetheilt, um die bedeutende Uebereinstimmung beider Reihen bei der langsamen Kohlensäureentbindung zu zeigen. Die Ursache für den bedeutenden Abfall in der Constanten liegt wohl darin, dass die höhere Temperatur für die proteolytischen Enzyme überaus günstig und die Concentration der Zymose eine sehr geringe ist.

Laevulose.

Tab. XI.

Concentration: 1,136 norm. ($a = 1$); 1,2 g Zymin. Temperatur: 24,5°.

t	a—x	0,4343 k	0,4343 k'
120	0,969	0,000114	0,000112
240	0,943	0,000106	0,000132
1260	0,714	0,000116	0,000101
1440	0,655	0,000127	0,000108

Versuche mit Rohrzucker ergaben zunächst das bekannte Resultat, dass der Zucker zuerst invertirt wird und hierauf das Gemisch von Trauben- und Fruchtzucker erst vergohren wird. Weiter soll dieser Vorgang hier nicht untersucht werden.

Mit Beziehung auf das mitgetheilte Zahlenmaterial lässt sich wohl sagen, dass die Constanten der 3. Kolumne im Allgemeinen genügende Uebereinstimmung zeigen. Die Constanten der 4. Kolumne entsprechen mitunter etwas besser, mitunter viel schlechter. Eine Entscheidung möchte ich schon im Hinblick auf die anfangs gegen die Versuchsanordnung gemachten Einwände zunächst nicht treffen. Es bleibt ferner wohl noch abzuwarten, inwiefern andere Fermentreactionen der Henri'schen Formel folgen. Das Anwachsen der Constanten im Laufe der Reaction, das öfters auftritt und dem eben die Henri'sche Formel Rechnung trägt, könnte in unserem Fall vielleicht auch durch Stoffe herbeigeführt werden, die sich bei den zahlreichen Spaltungsprocessen im toten Zelleib bilden.

Beziehung zwischen Anfangsconcentration und Geschwindigkeitsconstante. In der schon mehrfach erwähnten Abhandlung Henri's über die Wirkung des Invertins wird mitgetheilt, dass $k \cdot a$ (dort $2 k \cdot a$) nicht, wie es nach Duclaux's Annahme sein müsste, constant bleibt. Dasselbe gilt für den behandelten Fall. Wird a kleiner, so wächst k a bei gleichbleibender Fermentmenge.

Einfluss der Fermentmenge auf den Umsatz. Bei der Katalyse von Wasserstoffsuperoxyd durch colloidales Platin fanden Bredig und Müller von Berneck¹⁾

$$\frac{k_1}{k_2} = \left(\frac{c_1}{c_2} \right)^b$$

wenn k die Geschwindigkeitsconstante und c die Fermentconcentration bedeutet. b schwankt bei Platinsolen zwischen 1,3 und 1,6.

Demselben Ausdruck gehorcht nach E. Schütz²⁾ die Pepsinwirkung, nach Pawlow³⁾ und Vernon⁴⁾ die Trypsin-, Steapsin- und Ptyalinwirkung ($b = \frac{1}{2}$), nach Medwedew⁵⁾ das Oxydationsferment der Leber unter gewissen Bedingungen ($b = 2$).

Die gleiche Beziehung besteht für den hier untersuchten Fall:

$$\frac{k_1}{k_2} = \left(\frac{c_1}{c_2} \right)^2$$

Beobachtet:

$c_1 = 1,2$	$k_1 = 0,00018$	$k_1 : k_2 = 0,4$ gefunden,
$c_2 = 1,8$	$k_2 = 0,00045$	$k_1 : k_2 = 0,44$ berechnet.
$c_1 = 0,6$	$k_1 = 0,00004$	$k_1 : k_2 = 0,22$ gefunden,
$c_2 = 1,2$	$k_2 = 0,00018$	$k_1 : k_2 = 0,25$ berechnet.
$c_1 = 1,2$	$k_1 = 0,00018$	$k_1 : k_2 = 0,75$ gefunden,
$c_2 = 1,5$ ⁶⁾	$k_2 = 0,00024$ ⁶⁾	$k_1 : k_2 = 0,8$ berechnet.

Einfluss der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Nach der vant' Hoff-Arrhenius'schen Gleichung: ⁷⁾

$$\ln \frac{k_1}{k_2} = A \cdot \frac{T_1 - T_2}{T_1 \cdot T_2}$$

1) Z. f. physik. Chem., Bd. 31, S. 315 (1899).

2) Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 577 (1887).

3) Arbeit der Verdauungsdrüsen (1898).

4) Journ. of physiol., Bd. 26, S. 420 (1901).

5) Pflüger's Archiv, Bd. 65, S. 249 (1896); Bd. 74, S. 193 (1899); Bd. 81, S. 540 (1900).

6) Nicht in den Tabellen enthalten.

7) Z. f. physik. Chem., Bd. 4, S. 226 (1889). vant' Hoff-Cohen, Dynam. Studien, S. 128.

konnten Tammann¹⁾ und Bredig²⁾ die Constanten bei verschiedener Temperatur berechnen.

Folgende Versuche zeigen, dass die Gleichung auch den Gesetzen der alkoholischen Gährung annähernd entspricht.

Temperatur 243°	+ 14,5°	+ 20°	+ 24,5°	+ 28,5°
0,4343 k beobachtet	0,000051 ³⁾	0,000090 ³⁾	0,000147	0,00018
0,4343 k berechnet	—	0,000081	—	0,00021

$$A = 3932.$$

Es war auch ein Versuch bei höherer Temperatur (273 + 33°) angestellt worden, um eventuell das für Fermentwirkung bekannte Maximum kennen zu lernen, doch zeigte sich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit zuerst anstieg und dann wieder ziemlich rasch abfiel. Es ergab sich, wie auch Duclaux und Ernst gezeigt haben, dass dies Maximum durchaus mit der Vorgeschichte des Systems schwankt. Die Ursache dieses Verhaltens ist wohl darin zu suchen, dass die höhere Temperatur für tryptische Enzyme besonders günstig ist und das Zymin mit mehr oder weniger grosser Geschwindigkeit je nach der Temperatur zu Grunde geht.

Es scheint mir also in der That, dass der Nachweis für die katalytische Natur der alkoholischen Gährung mit Hülfe der allgemeinen Betrachtungsweise der chemischen Dynamik gelungen sei.

Ich möchte auch an dieser Stelle Herrn Prof. Bredig für freundlichen Rath herzlich danken.

¹⁾ Z. f. physik. Chem., Bd. 18, S. 433 (1895).

²⁾ Anorg. Fermente, S. 64. Vergl. auch Ernst, Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. 37. S. 448 (1901).

³⁾ In den Tabellen nicht enthalten.