

897. Carl Neuberg:
Von der Chemie der Gärungs-Erscheinungen.

{Zusammenfassender Vortrag, gehalten auf Veranlassung der Deutschen Chemischen Gesellschaft bei der Hundertjahrfeier der Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte in Leipzig am 20. September 1922.]

(Eingegangen am 4. November 1922.)

Das Jahr 1922 ist eine Jubiläumszeit nicht nur für die Versammlung der Deutschen Naturforscher und Ärzte, sondern auch für das Gebiet, über das ich eine kurze Zusammenfassung zu geben habe. Es sind gerade 100 Jahre verflossen, seitdem Döbereiner den chemisch wie biologisch gleich bedeutsamen Zusammenhang zwischen Alkohol und Acetaldehyd aufgedeckt und Avogadro die richtige Formel des Weingeistes gefunden hat. In kurzem kehrt zum 100sten Male der Tag wieder, an dem der große Meister der Gärungslehre, Louis Pasteur, in seine irdische Laufbahn eintrat. Zwar röhrt von ihm der Ausspruch her: es verlohnt sich nicht, auf Erreichtes zurückzusehen, ein Wort, dem wohl mancher Naturforscher beipflichtet; aber in der gehobenen Festesstimmung 100ster Geburtstagsfeiern entspricht eine Rückschau der Ge pflogenheit.

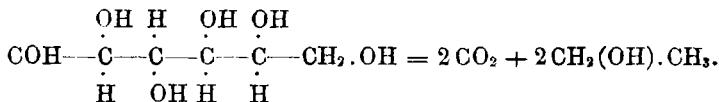
Etwas mehr als ein halbes Säkulum ist vergangen, seit ein Chemiker der Universitätsstadt, in der wir tagen, Johannes Wislicenus, zusammen mit dem Physiologen Fick seinen berühmt gewordenen Aufstieg vom Brienzer See auf das Faulhorn unternahm. Beide Gelehrten sammelten sorgfältig die Ausscheidungen ihres Körpers und berechneten aus dem Stickstoffgehalt derselben, daß die stattgehabte Eiweiß-Zersetzung keineswegs ausgereicht hatte, um die zur Hebung ihrer Körper aufgewendete Arbeit zu leisten. Seit diesem grundlegenden Versuche weiß man, daß nicht die Proteine, sondern neben den Fetten in erster Linie die Kohlenhydrate die Quelle der Muskelkraft und aller energetischen Verrichtungen sind. Das trifft nicht nur für den Menschen und die Tiere zu, sondern auch für die höher entwickelten Vegetabilien und Mikroorganismen.

So tritt uns der Umsatz der Kohlenhydrate als einer der bedeutungsvollsten Prozesse im Haushalte der Natur entgegen.

Der Biochemiker kann sich nicht auf die rein deskriptive Behandlung eines Gebietes beschränken, das ein Zentralproblem seiner Wissenschaft darstellt. Der Versuch, in den Mechanismus der Erscheinungen einzudringen, ist am aussichtsreichsten

bei den Mikroorganismen, besonders auch deshalb, weil es sich hier vielfach um Zellen von höchster Anpassungsfähigkeit an künstlich im Experiment geschaffene Bedingungen handelt. Hinzu kommt, daß die Aufgabe dadurch erleichtert wird, daß im Stoffwechsel der Kleinlebewesen Verbindungen auftreten, die sozusagen von Natur aus Zwischenerzeugnisse darstellen, indem, soweit Kohlenhydrate das Ausgangsmaterial bilden, nicht einfach Kohlensäure und Wasser als Endprodukte einer vollkommenen Verbrennung entstehen, sondern kompliziertere Gebilde übrig bleiben. Das klassische Beispiel für dieses Geschehen finden wir bei der alkoholischen Gärung.

Die qualitativen und quantitativen Verhältnisse bei der geistigen Gärung wurden, im wesentlichen bereits zutreffend, von Gay-Lussac im Jahre 1815 festgestellt. Die später ein wenig modifizierte und berichtigte Gärungsgleichung lautet:



Diese Formulierung sagt allerdings nicht das Geringste über die sich abspielenden Vorgänge aus. Denn in dem uns vertrauten Konstitutionsbilde des Traubenzuckers sind weder die Reste des Äthylalkohols noch Kohlendioxyd-Gruppen vorgezeichnet. Sicher ist nur, daß bedeutende innere Transformationen sich abgespielt haben müssen, bevor ein derartiger Einsturz des im Zucker vorhandenen 6-Kohlenstoff-Baues stattgefunden hat.

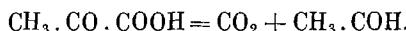
So bietet selbst das einfach erscheinende Problem der alkoholischen Gärung der Ergründung Schwierigkeiten. Man wird daran ermessen, welche Rätsel und Aufgaben das allgemeine Problem des Kohlenhydrat-Umsatzes in der Natur einschließt.

Die von Gay-Lussac eingeleitete Periode der Gärungsfor schung ist mit E. und H. Buchner, M. Hahn und Meisenheimer zu einem gewissen Abschluß gelangt. Sie griffen in den Kampf zwischen der vitalistischen Auffassung Pasteurs und der rein chemischen Lehre Liebigs durch die Feststellung ein, daß gewissermaßen beiden Ansichten eine Berechtigung zukommt: Bislang keine alkoholische Gärung ohne lebende Zelle, aber das von ihr produzierte Gärungsferment, die Zymase, ist vom lebenden Organismus abtrennbar.

Das Problem des Chemismus des Gärungsvorganges ist damit seiner Lösung nicht zugeführt. Zahlreiche Theorien wechselten ab. Alle Produkte, die man nachein-

ander als denkbare Zwischenstufen des Zucker-Abbaues in Betracht zog, hielten nicht der auf das Experiment sich stützenden Kritik stand. Keines wurde von Hefe angegriffen oder wenigstens nicht zu Weingeist und Kohlensäure umgeformt.

Eine unerwartete und weiterführende Beobachtung konnte ich im Jahre 1910 machen. Es zeigte sich, daß die Brenztraubensäure von Hefe glatt und leicht vergoren wird. Diese Substanz, die gegen chemische Einflüsse überaus widerstandsfähig ist, erfährt eine Zersetzung durch Hefe schon bei gewöhnlicher Temperatur. Sie zerfällt in Acetaldehyd und Kohlensäure:



Weitere Untersuchungen ergaben, daß der Vorgang enzymatisch ist; denn das Agens, das die Brenztraubensäure spaltet, ließ sich von der Hefezelle abtrennen und als Ferment kennzeichnen. Wegen seiner augenfälligen Wirkung, der Loslösung von Kohlensäure, erhielt das Enzym den Namen Carboxylase. Für die Stellung der Carboxylase im Ferment-System ist der Umstand wichtig, daß die Carboxylase überall das Gärungsferment Zymase begleitet, bei Hefen wie anderen Mikroorganismen und höheren Pflanzen, die zymatische Fähigkeiten entfalten können. Somit besteht der Satz zurecht: Keine Zymase ohne Carboxylase:

Trotzdem läßt sich zymase-freie Carboxylase erhalten. Durch Vergiftung oder Erhitzung vermag man die Gesamt-Zymase so zu beeinträchtigen, daß der restierende Ferment-Anteil Zucker nicht mehr angreift, wohl aber noch Brenztraubensäure. Durch Dialyse oder Ultrafiltration kann man ebenfalls von der Zymase ein Partialferment abscheiden, das nur noch gegen Brenztraubensäure gerichtet ist.

Wie nun Zymase nicht spezifisch auf Traubenzucker eingestellt ist, sondern noch andere Zuckerarten angreift, so wendet sich die Carboxylase auch gegen die Homologen der Brenztraubensäure. Der Reaktionsverlauf ist prinzipiell gleichartig; es entstehen nämlich CO_2 und der nächst niedere Aldehyd, der dann sekundär weitere Umformungen erleiden kann. Dieses Verhalten der Carboxylase weist zugleich darauf hin, daß das Ferment nicht nur beim Kohlenhydrat-Umsatz, sondern auch beim Eiweiß-Stoffwechsel in Funktion tritt; Neubauer und Fromherz haben die Anschauung entwickelt, daß die bei der Protein-Hydrolyse auftretenden α -Amino-säuren durch Desaminierung und Oxydation in eben jene α -Keto-säuren übergehen. Im Zusammenhang damit haben sie gezeigt, daß diese α -Keto-säuren, wenn man sie einer mit lebender Hefe gärenden Zucker-Lösung zumischt, dieselben Alkohole liefern können, wie dies F. Ehrlich für die zugehörigen α -Amino-säuren dargetan hatte. Brenztraubensäure und ihre Homologen werden aber, wie erwähnt, auch in Abwesenheit von Zucker durch Hefe-Ferment ohne weiteres carboxylatisch gespalten, und ein Gleichtes scheint für

andere Carbonsäuren zu gelten, wie wir im Jahre 1911 und neuerdings Jung und Müller aus Spiros Laboratorium berichteten.

Die physiologische Bedeutung der Brenztraubensäure und der Carboxylase enthüllte sich bald in mannigfachen Beobachtungen; u.a. fanden Beijerinck und Folpmers, Fernbach und Schön, sowie Mazé und Ruot eine Reihe oxydierend wirkender Bakterien und Pilze, deren katabolischer Stoffwechsel auf der Stufe der Brenztraubensäure stehen bleibt¹⁾. Es handelt sich hier offenbar um biologische Vorgänge, bei denen ein Produkt erzeugt wird, dessen Abbau in der Natur — wie so oft — von anderen Lebewesen vollendet wird.

Physiologische wie chemische Befunde waren es, die nachdrücklich in die 3-Kohlenstoff-Reihe als Durchgangsstätte beim Zucker-Zerfall wiesen. Sie bildeten das Leitseil für den Gedanken, die wirklichen Zwischenprodukte des Zucker-Abbaues in der C₃-Reihe zu suchen. Die Gärungs-Erscheinungen der Brenztraubensäure und die Beziehung des auf sie eingestellten Fermentes, der Carboxylase, zum Zymase-Komplex räumten von vornherein dieser Keto-säure aus der 3-Kohlenstoff-Reihe einen besonderen Platz ein.

Im Jahre 1913 gaben Neuberg und Kerb den Teilvergängen beim Zerfall des Hexose-Moleküls in Alkohol und Kohlensäure folgende schematische Formulierung:

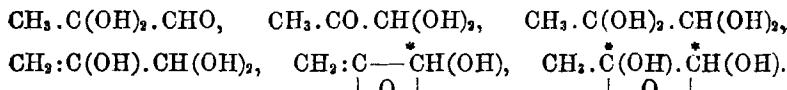
- a) C₆H₁₂O₆—2H₂O = 2CH₃.CO.CO_H (Methyl-glyoxal),
- $\beta)$ CH₂:C(OH).COH + H₂O $\xrightarrow[\text{O}]{\text{H}_2}$ CH₂(OH).CH(OH).CH₂(OH) $\xrightarrow{\text{CH}_2:\text{C(OH).COH}}$ (Glycerin)
CH₂:C(OH).COH $\xrightarrow{\text{H}_2}$ CH₂:C(OH).COOH (Brenztraubensäure),
- $\gamma)$ CH₃.CO.CO_H = CO₂ + CH₃.COH (Acetaldehyd),
- $\delta)$ CH₃.CO.CO_H $\xrightarrow[\text{CH}_2.\text{COH}]{\text{O}}$ CH₃.CO.CO_H (Brenztraubensäure)
 $\xrightarrow{\text{H}_2}$ CH₃.CH₂.OH (Alkohol).

Die Arbeiten der folgenden Jahre haben gelehrt, daß keinerlei Ergebnisse mit diesem Abbilde bisher in Widerspruch geraten. Wichtige Teile des obigen Umrisses ließen sich experimentell verifizieren, andere sind noch Hypothese, dürften aber zurzeit als

¹⁾ Interessant ist im Zusammenhang mit der weiter unten gewürdigten Rolle des Methyl-glyoxals die von Baudisch und Johnson unlängst beschriebene Entstehung von Brenztraubensäure und Acetol aus Thymin.

bester Ausdruck der ermittelten Tatsachen gelten. Die Gleichung α obiger Formelbilder besagt, daß zuförderst das Hexose-Molekül durch doppelte Entziehung von Wasser in 2 Mol. des 3-Kohlenstoff-Körpers Methyl-glyoxal, vielleicht über ein Methylglyoxal-alcohol, zerrissen wird. Die Berechtigung einer derartigen Annahme, die übrigens von Wohl wie von Windaus und Knoop nebst Erlenmeyer bereits gemacht ist, ergibt sich aus der rein chemischen älteren Beobachtung, daß Zucker bei Behandlung mit heißer starker Lauge Methyl-glyoxal liefern kann. Neuberg, Örtel und Rewald haben festgestellt, daß auch schwach basisch reagierende Stoffe, wie Soda, Bicarbonat, Ammoniak, Phosphate, Sulfite, Borax und Natriumacetat, den gleichen Übergang bei niederer Temperatur herbeiführen. Alle weiteren Veränderungen kommen alsdann auf eine mehrmalige Dismutation (Cannizzaro'sche Umlagerung) heraus. Bei der ersten werden Brenztraubensäure und durch irgendeine Addition von Wasser Glycerin geschaffen. Sobald dann die Brenztraubensäure durch Carboxylase in Kohlendioxyd und Acetaldehyd zerlegt wird, findet nunmehr die Dismutation zwischen zwei verschiedenen Aldehyden, zwischen Acetaldehyd und Methyl-glyoxal, statt. Dabei bilden sich Äthylalkohol und Brenztraubensäure. Letztere wird durch die Carboxylase stets von neuem in Kohlendioxyd und Acetaldehyd zersetzt. Immer entsteht und ständig zerfällt die Brenztraubensäure. Nachdem 1913 von Neuberg und Dakin ein Ferment aufgefunden ist, das Methyl-glyoxal in Milchsäure überführt, also eine innere Dismutation besorgt, so läßt sich das Auftreten der Hauptprodukte und Nebenerzeugnisse bei der alkoholischen Gärung mit diesem Paradigma erklären. Die Annahme der gemischten Dismutation zweier Aldehyde (Gleichung δ) ist durch eine Verwirklichung dieser Reaktion in der aliphatischen Reihe von meinem Mitarbeiter Nord gestützt.

Obiges Schema bedient sich der einfachsten Schreibweise für das Methyl-glyoxal, insbesondere unterblieb die Formulierung von Hydraten und optisch aktiven Modifikationen, die zahlreich denkbar sind und von denen einige wenigstens erwähnt seien:



Das geschieht deshalb, weil die einzige, bisher darstellbare, offenbar stabilste, monomolekulare Form des Methyl-glyoxals von Buchner und Meisenheimer sowie P. Mayer als gärungsfähig befunden wurde. Es bieten sich aber der Vorstellung keine Schwierigkeiten, daß labile Modifikationen und gegebenenfalls optisch aktive Formen den Abbau vermitteln.

Übrigens hat Lebedew jüngst angegeben, daß Methyl-glyoxal von einer bestimmten Trockenhefe und ihrem Saft typisch vergoren werde; erweist sich dieses Verhalten als allgemein zutreffend, so würde die Formulierung nach Gleichung α) ein hohes Maß von Berechtigung erlangen. (Die Vorgänge, die in den Fassungen β), γ) und δ) ihren Ausdruck finden, werden nachstehend behandelt.)

Mit voller Absicht sind andere Möglichkeiten für die Darstellung der abwechselnden Oxydations- und Reduktionsvorgänge am Zucker-Molekül sowie eine eventuelle, aber bislang niemals bewiesene zymochemische Bedeutung der Triosen nicht berücksichtigt worden. Nicht angeführt ist auch eine etwaige, in ihrem Wesen noch ungeklärte Anteilnahme der Phosphorsäure am Gärungsvorgange. Hierüber liegen wichtige Arbeiten von Harden und Young sowie v. Euler vor. Neben anderen Gesichtspunkten, auf die der Kürze¹⁾ halber nicht eingegangen werden kann, ist der Umstand in Betracht zu ziehen, daß unter Bedingungen, bei denen bestimmte Hefen allenfalls phosphorylieren, d. h. in Gegenwart von viel Alkaliphosphat, die Gärung gar nicht den üblichen Verlauf nimmt, sondern daß nach der Formel der dritten Vergärungsform (s. u.) in nachher noch zu behandelnder Weise Essigsäure und Glycerin entstehen. Man darf, namentlich auch im Hinblick auf die Bedeutung, welche Zucker-Phosphorsäure-Verbindungen nach G. Embden und seinen Schülern für den tierischen Stoffwechsel haben, vielleicht mit einer anderen Möglichkeit rechnen. Es könnten analog den neuen Befunden von Willsätter und Steibelt, gemäß denen Disaccharide unmittelbar vergoren werden (ebenso wie nach voraufgegangener enzymatischer Hydrolyse zu den Monosacchariden) zwei Klassen von Hefepilzen existieren. Die einen würden den Zucker direkt umsetzen können, die andern den Weg über den Ester wählen. Aber ganz abgesehen von diesen Fragen liegt kein Anhaltspunkt dafür vor, daß die Phosphorylierung mit der Entstehung eines Zwischenproduktes niederer Molekulargröße einhergeht, und daß jene Synthese an sich, bei der ja das Gefüge des 6-Kohlenstoff-Zuckers erhalten bleibt, etwas mit dem Zucker-Abbau zu tun hat.

Immerhin könnte man sich vorstellen, daß bestimmte Hefen eine Kommutator-Wirkung äußern, indem sie die drei eigentlichen Zymo-hexosen Glucose, Fruchtzucker und Mannose über den Ester in ein und dasselbe abbaufähige Produkt umwandeln. Für dieses ist es modern geworden, die vor 22 Jahren von Wohl und Neuberg aufgestellte Enol-Formel

¹⁾ Um ihrer willen konnten nicht alle um das Gebiet verdienten Forscher nach Gebühr erwähnt werden und mußten überhaupt Literatur-Nachweise unterbleiben.

$\text{CH}_2(\text{OH}) \cdot [\text{CH} \cdot \text{OH}]_3 \text{C}(\text{OH}) \cdot \text{CH} \cdot \text{OH}$ des Zuckers zu benutzen, und sie tritt neuerdings besonders in der medizinischen Literatur auf, ohne daß bedacht wird, daß dieser Ausdruck ja nur einen Erklärungsversuch für den wechselseitigen Übergang der drei zusammengehörigen 6-Kohlenstoff-Zucker bedeutet und daß man das Enol-Gebilde bisher niemals wirklich gefaßt hat.

Bei der überraschenden Leichtigkeit, mit der sich unter dem Einfluß verschiedener Alkalisatoren auf chemischem Wege der Übergang von gärfähigen Zuckern in die 3-Kohlenstoff-Reihe vollzieht, lag der Gedanke nahe, ähnliche Hilfsmittel zur Stabilisierung von Zwischenerzeugnissen der alkoholischen Gärung selbst zu verwenden.

Die Untersuchung des Gärungsverlaufs bei alkalischer Reaktion brachte in der Tat Ergebnisse, die einen tieferen Einblick in den intermediären Verlauf des Prozesses gestatteten und zugleich wertvolle Beweise für die Annehmbarkeit der zuvor dargelegten theoretischen Vorstellungen liefernten. Im Jahre 1916 teilten Neuberg und Färber mit, daß Vergärung im alkalischen Medium möglich ist und daß man zwei Gruppen von Alkalisatoren unterscheiden muß, solche wie Soda, Phosphat, Bicarbonat, also einfache, basisch reagierende Salze, und dann die gegen einzelne Indicatoren gleichfalls alkalisch reagierenden, sekundären Alkalisulfite, die im Gegensatz zu der erstgenannten indifferenten Gruppe eine wohlbekannte spezifische Affinität zu Carbonylresten aufweisen.

Die Autoren erkannten auch sofort die Abartung des Gärungs-Vorganges; sie fanden eine erhebliche Verringerung an Alkohol und Kohlensäure, die ja in der Norm zu rund je 50 % vom Gewichte des Zuckers gebildet werden; dafür konnten sie in ausgesorenen Sulfit-Maischen bedeutende Quantitäten Acetaldehyd und Glycerin feststellen. Der Acetaldehyd liegt nicht in freiem Zustande vor, sondern das schwefligsaure Salz vereinigt sich mit ihm, sobald er entsteht, zum Aldehyd-Sulfit-Komplex und häuft ihn in Gestalt dieser Doppelverbindung an. Man kann aus dem Gärget das Acetaldehyd-Natriumbisulfit in fester Form abscheiden. Der Acetaldehyd wurde zunächst in einer Ausbeute von 74 % und neuerdings von Kumagawa sogar von 80 % der theoretisch möglichen Menge gewonnen.

Durch die Isolierung so beträchtlicher Quantitäten Acetaldehyds ist nunmehr auch mit Zucker als Ausgangsmaterial die durch Vergärbarkeit von Brenztraubensäure längst realisierte Gleichung γ) erfüllt, welche das Auftreten des Aldehyds als Zwischenstufe verlangt.

Die Methode, die sich der relativ ungiftigen sekundären schwefligsauren Salze zum Eingriff in den Gärakt bedient, haben wir, weil sie den Acetaldehyd festhält, als »Abfangverfahren« bezeichnet.

Da der Acetaldehyd nun im Vergleich mit dem normalen Gärungsprodukt Weingeist ein Oxydationserzeugnis darstellt, so mußte eine reduktive Gegenwertsleistung nachweisbar sein. Entweder konnte der Wasserstoff, der gemäß unserem Gärungsentwurf, und zwar nach der Gleichung δ), schließlich der Hydrierung des Acetaldehyds zum Sprit dient, frei mit den Gärungsgasen entweichen, oder es mußte in korrelativer Menge ein Reduktionsprodukt entstehen. Letzteres ist mit weitgehender Genauigkeit der Fall. Es tritt eine äquimolekulare Menge Glycerin auf, wie es auch Zerner später mit anderen Analysenmethoden dargetan hat.

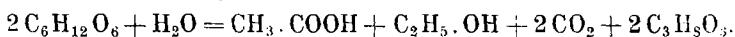
Wenn man von der vorher erwähnten Bindung des Acetaldehyds an Sulfit absieht, so erhält man folgenden Ausdruck für die neue Art des Zucker-Zerfalls:



Wir haben diesen Abbau — zum Unterschiede gegen die bis dahin allein bekannte Gay-Lussacsche Normalgleichung vom Jahre 1815 — die zweite Vergärungsform genannt. Sie kann mit allen Zymo-hexosen verwirklicht werden, auch mit *d*-Galaktose, wie M. Tomita nachwies. Da nun der Acetaldehyd-Sulfit-Komplex nicht ganz beständig ist, so kommt es, daß die zweite Vergärungsart nicht zu 100% herbeizuführen ist, sondern nur zu einem Betrage, der von den Gleichgewichts-Verhältnissen und der Empfindlichkeit der verwendeten Hefen gegen das Abfangmittel Sulfit bedingt ist. Nach den Feststellungen von Neuberg und Reinfurth werden nun auch die diversen Pyruvinat-Sulfit-Komplexe überraschend schnell und glatt zu Kohlensäure und Aldehyd-Sulfit vergoren, und so können Acetaldehyd wie Brenztraubensäure, die ja nichts weiter als Carboxy-acetaldehyd ist, als Durchgangsstufen der Gärung gelten. Theorie und Experiment besagen, daß wenn 1 Mol. Acetaldehyd abgefangen und von der weiteren normalen Verarbeitung ausgeschlossen wird, 1 Mol. Glycerin und 1 Mol. Kohlensäure auftreten.

Die Aufklärung der Sulfit-Wirkung lieferte auch den Schlüssel zum Verständnis für die Betätigungsweise der eigentlichen alkalischen Salze. Wieder beobachteten wir einen Fehlbe-

trag an Kohlendioxyd und Weingeist. Die Fahndung auf fremde Stoffe hat in diesen Fällen zu einem neuen Resultat geführt. Wenn die Gärung einsetzt, erscheint zunächst auch hier Acetaldehyd in vermehrter Menge; am Ende aber sind nur noch Spuren vorhanden. Dagegen findet man sehr erhebliche Quantitäten Glycerin. Schon zu Beginn unserer Gärungs-Untersuchungen haben Neuberg und Mitarbeiter und sodann auch Kostytschew darauf hingewiesen, daß Hefe eine Dismutation von Aldehyden herbeiführen kann. Das Ferment, das diese Umwandlung vollzieht, die **Aldehyd-Mutase**, wirkt am besten gerade bei schwach alkalischer Reaktion. Demzufolge treten bei der Vergärung unter Zugabe einfacher alkalischer Salze an Stelle des Acetaldehyds seine Dismutationsprodukte **Essigsäure** und **Alkohol** auf. Wie man sieht, ist es abermals der Eingriff an der reaktionsfähigen Gruppe des Acetaldehyds, mit dem der abgeänderte Verlauf der Gärung einhergeht. Grundsätzlich entspricht er dem Wesen der zweiten Vergärungsform, aber es fehlt das spezifische Abfangmittel für den Acetaldehyd. Er wird disloziert, und die Gleichung der erfolgenden Umsetzungen nimmt die Gestalt an:



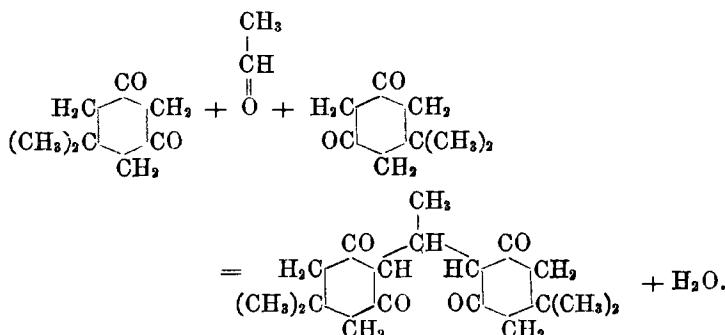
Diese Art der Zucker-Abspaltung durch Hefe haben Neuberg und Hirsch als dritte Vergärungsform bezeichnet. Der Theorie entsprechend, stehen hier Essigsäure und Glycerin in Abhängigkeit von einander, und zwar walitet die Beziehung ob, daß 1 Mol. Essigsäure auf 2 Mol. Glycerin entfällt.

Neuberg und Ursum haben sodann festgestellt, daß eine große Reihe von alkalisch reagierenden Verbindungen anorganischer und organischer Natur die dritte Vergärungsform auslösen, und zwar bei sämtlichen gärfähigen Zuckern, auch bei Rohrzucker, der, entgegen älteren Anschauungen, in alkalischer Lösung ebenfalls vom Invertin der Hefe hydrolysiert wird.

Es ist nicht verwunderlich, daß die verschiedenen Vergärungsformen in der Natur nebeneinander ablaufen. Der Gehalt der Brunnenwässer an alkalisch reagierenden Salzen kann den Eintritt der dritten Vergärungsform veranlassen. Tatsächlich entsteht bei jeder alkoholischen Gärung immer eine kleine Menge **Essigsäure**, und man darf in ihrer Bildung das Bestreben der Hefe erblicken, die für möglichste Gleichmäßigkeit ihres Stoffwechsels optimale Acidität aufrecht zu erhalten, über deren Größe wir durch die Untersuchungen von Lüers, Hägglund sowie Boas und Leberle unterrichtet sind. Ist die Umgebung zu alkalisch, so bringt die Hefe auf Kosten des Zuckers Säure, und zwar überwiegend Essigsäure, hervor, bis sie eine ihr passende Umgebung erzeugt hat. Werden die Alkalimengen zu stark, als daß sie durch die natürliche Säuerungskraft der Hefe paralysiert werden könnten, so setzt ausgesprochenermaßen die

dritte Vergärungsform ein. Aber auch die zweite Vergärungsform dürfte sich in der Natur abspielen. Bei jeder gewöhnlichen Gärung treten kleine Mengen von Glycerin auf, 2–3%, die zweifelsohne dem Zucker, und nicht irgendwelchen Lipoiden oder Eiweißstoffen der Hefe entstammen. Dieser Glycerin-Gehalt der ausgegorenen Maischen ist ein Ausdruck dafür, daß unter normalen Bedingungen ebenfalls Faktoren wirksam sind, die eine Abweichung von der Gay-Lussacschen Idealgleichung bewirken. Man kann dies so erklären, daß Acetaldehyd oder seine Vorstufe Brenztraubensäure während der Gärung einem vielseitigen Verbrauche unterliegen zu Zwecken der Synthese und des Erhaltungsumsatzes. Dieses interne Verschwinden von Aldehyd oder Brenztraubensäure stellt eine »physiologische Abfangung« dar. Hier wird ebenso wie bei der künstlichen Fixierung des Aldehyds Wasserstoff disponibel und zur Reduktion von Zucker-Halbmolekülen benutzt, die Glycerin liefert.

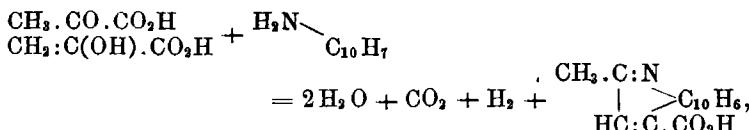
Die anorganischen Salze dringen nicht oder kaum durch die äußeren Zellschichten hindurch. Für bestimmte Probleme war es erwünscht, Abfangmittel zu besitzen, die lipoid-löslich oder permeabel sind. Diese Forderung erfüllt das Dimedon-Verfahren von Neuberg und Reinfurth. Es bewirkt auf einem ganz anderen Wege eine Ausschaltung des Acetaldehyds aus der Reaktionsfolge der Gärungs-Vorgänge. Nach einer älteren, bis zu unseren Untersuchungen nicht gewürdigten Beobachtung von Volland er kondensieren sich einfache Aldehyde mit dem 5,5-Dimethyl-cyclo-hexandion-(1,3) (Dimethyl-hydroresorcin) leicht unter Abspaltung von Wasser:



Zuckerarten und Ketone sind zu dieser Reaktion nicht befähigt. Somit wird von den Stoffen, die auf der Kaskade der Zucker-Zerfallsprodukte liegen, wiederum nur der Acetaldehyd abgefangen.

Mit Hilfe dieser Methode wurde auf eine neue Art das gleiche Ergebnis erzielt und dadurch die Brauchbarkeit und die Vertrauenswürdigkeit der entwickelten Anschauungen abermals dargetan.

Die Möglichkeit, die Brenztraubensäure selbst durch ein weiteres »Abfangverfahren« aus der Reihe der Zucker-Zerfallsprodukte auszuscheiden, hat von Grab durch Verwirklichung der Döbnerschen Synthese angegeben. Es entstand bei zellfreier Gärung unter Zugabe von β -Naphthylamin die α -Methyl- β -naphtho-cinchoninsäure:



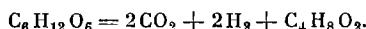
in der die zwischendurch auftretende Brenztraubensäure steckt. Diese Synthese verläuft ohne jede Sauerstoff-Zufuhr und kann als Beweis für die anaerobe Entstehungsweise der Brenztraubensäure beim Gärungsvorgange gelten. Nach einer Mitteilung aus jüngster Zeit hat auch Abderhalden durch Vergärung in Gegenwart von Tierkohle eine etwas vermehrte Bildung von Aldehyd beobachtet.

Es ist noch darauf hinzuweisen, daß sowohl die zweite als die dritte Vergärungsform eine Anwendung in der Technik gefunden haben. Bekannt ist, daß nach diesen Prinzipien Connstein und Lüdecke während des Krieges eine industrielle Erzeugung von Glycerin ermöglicht haben, und der auffallend hohe Aldehyd-Gehalt des sog. Sulfit-Sprits, der bei der Vergärung von Sulfit-Ablaugen der Cellulose-Fabrikation gewonnen wird, beruht nach den Darlegungen von Neuberg und Reinfurth, Hägglund und Sieber auf dem Eintritt der zweiten Vergärungsform unter dem Einflusse des vorhandenen schwefligsauren Calciums.

Die zentrale Stellung, die der so bewegliche Acetaldehyd und die ungeheure reaktionsfähige Brenztraubensäure ersichtlich beim Vorgange der Zucker-Spaltung mittels Hefe einnehmen, hat sich nun auch durch Anwendung des Abfangverfahrens auf die Vergärungen enthüllt, die durch verschiedene Bakterien und Sproßpilze zu-stande kommen.

Zusammen mit Nord, Wolff und Cohen fand ich, daß bei der Umsetzung des Zuckers und nahestehender Substanzen, wie Mannit und Glycerin, durch gewöhnliche und pathogene Mikroorganismen, z. B. durch das Bacterium coli, durch den stets im Magen-Darmkanal anwesenden Bacillus lactis aerogenes, durch die Erzeuger der Ruhr, sowie durch die Erreger des im vergangenen Weltkriege so sehr gefürchteten Gasbrandes, Acetaldehyd mit Hilfe des Abfangverfahrens zutage gefördert wird. Das Gleiche geschieht u. a. bei der Zersetzung des Zuckers durch Aspergillen, Kahm, Penicillien, Mucoraceen und Arten von Torula, deren Umwandlung in Kulturhefe jüngst Hayduck und Haehn gelehrt haben, und es gilt nach Peterson und Fred auch für bakterielle Pentosen-Gärungen.

In vielen Fällen vollzieht sich die Spaltung der Hexosen durch Kleinlebewesen nach Art der dritten Vergärungsform, indem der Acetaldehyd durch Dismutation Sprit und Essig liefert, während der Wasserstoff in diesen Fällen keinen Acceptor findet, sondern frei entwickelt wird: Wasserstoff-Gärung. Ihr wichtigstes Beispiel liegt in der Buttersäure-Gärung vor, und für diese habe ich mit Arinstein gezeigt, daß hier Acetaldehyd und Brenztraubensäure in ähnlicher Weise Durchgangsglieder bilden. Mit der Abfangmethode kann man wiederum in großen Mengen Acetaldehyd ans Licht ziehen. An der Brenztraubensäure spielt sich scheinbar eine Aldol-Kondensation ab, und das entstandene Produkt geht unter Decarboxylierung durch eine Art von Saccharin-Umlagerung in Buttersäure über. Ihr Bildungsmodus stellt gewissermaßen eine vierte Vergärungsform dar. Die zusammengezogene Idealformulierung lautet:



Wie man sieht, trifft der Wasserstoff hier auf keinen organischen Acceptor, und schon früher habe ich darauf hingewiesen, daß Erregern von Butyl-Gärungen die Fähigkeit eigen ist, den atmosphärischen Stickstoff zu binden. Vielleicht ist die Vorstellung nicht zu kühn, daß gerade der Hub auf die Oxydationsstufe der Brenztraubensäure und des Acetaldehyds diesen Lebewesen den Wasserstoff zur Verfügung stellt, der im atomaren Entstehungszustande eine »Haber-Synthese« herbeiführt.

Aus alledem ergibt sich, daß bei den Erscheinungen des Ab- und Umbaus der Acetaldehyd für verschiedene Organismen eine ähnliche Bedeutung hat, wie der Formaldehyd bei der Assimilationsleistung der grünen Gewächse.

Im allgemeinen verbindet man mit dem Begriff »Gärung« die Vorstellung, daß es sich hier um eins der physiologischen Hilfsmittel handelt, mit denen die Organismen große Moleküle abtragen. Die Gärung erscheint als ein Werkzeug der Spaltung. Mit diesen Molekül-Verkleinerungen sind jedoch aufbauende Reaktionen eng verknüpft. Das offenbart sich bereits in dem Umstande, daß die arbeitenden Lebewesen aus den Bruchstücken des durch Gärung zertrümmerten Materials neue Leibessubstanz zusammensetzen. Daher war es von nicht geringem Interesse, Fermente von kern-synthetischer Funktion aufzuspüren. Seit langem kennen wir zwar enzymatische Synthesen, wie den Aufbau von Fettsäure-estern, Disacchariden oder Peptiden mit Hilfe der Lipasen, Glucosidasen und Proteasen, allein bei diesen Molekül-Verknüpfungen finden genau wie bei den reziproken Abbauprozessen Reaktionen zwischen Kohlenstoff- und Sauerstoff- oder Kohlenstoff- und Stickstoff-Atomen statt. Der Erfolg der Synthese besteht in der Herstellung derselben Bindungen, die bei der Aufspaltung gelöst werden. Es handelt sich um Anhydrisierungen, um rückgängig gemachte Hydrolysen.

Unter den Enzymen bilden eine Sondergruppe diejenigen Katalysatoren, die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Ketten zerreißen. Ihre Vertreter liegen in den Gärungsfermenten vor; Zymase und Carboxylase sind ihre Typen. Gewissermaßen eine Umdrehung der Gärungsvorgänge, d. h. die fermentative Vereinigung der Spaltprodukte von kurzer Kohlenstoffkette mittels ihrer C-Atome zu längeren Kohlenstoffketten, war noch nicht durchgeführt; jedoch sind ähnliche Reaktionen in der Natur offenbar von allergrößter Bedeutung, wie schon das einzige Beispiel der biologischen Fettbildung aus Zucker lehrt. Der Nachweis eines Fermentes mit kern-synthetischer Funktion, und zwar für die gradlinige Aneinanderlagerung von verschiedenen, freiwillig mit meßbarer Geschwindigkeit nicht mit einander reagierenden Molekülen — ohne Mitwirkung irgendwelcher Oxydationen oder Reduktionen — ist erst in jüngster Zeit gelungen. Ein solches Enzym haben Neuberg und Hirsch beschrieben und wegen seines sinnfälligsten Effektes — eben der unmittelbaren Knüpfung mehrgliedriger Kohlenstoff-Kohlenstoff-Ketten — Carboligase genannt.

Setzt man beispielsweise zu einer gärenden Zucker-Lösung Benzaldehyd, so entsteht neben Benzylalkohol¹⁾ u. a. in beträchtlicher Menge ein Produkt, das formelgemäß aus je 1 Mol. Bittermandelöl und Acetaldehyd zusammengefügt ist. Dieser Körper besitzt nicht, wie am nächstliegenden erschien, Aldol-Bau, sondern er hat die Formel des isomeren α, β -Oxy-ketons, und zwar liegt nach der von Neuberg und Ohle ausgeführten Konstitutionsbestimmung das Phenyl-acetyl-carbinol, $C_6H_5 \cdot CH(OH) \cdot CO \cdot CH_3$, vor. Diese Verbindung, die auch als α -Phenyl-brenztraubenalkohol bezeichnet werden kann, läßt sich auf rein enzymatischem Wege, d. h. bei der zellfreien Vergärung, gewinnen. Bemerkenswert ist, daß das Ferment Benzaldehyd und fertigen Acetaldehyd nicht zusammenzuschließen vermag; wohl aber kann der Acetaldehyd in Form seiner unmittelbaren Vorstufe, der Brenztraubensäure, angewendet werden. Vielleicht hängt dieses Verhalten damit zusammen, daß die bei der Carboxylase-Spaltung herrschenden energetischen Bedingungen oder eine im Augenblick der Entstehung reaktionsfähigere Form des Acetaldehyds für die Kohlenstoff-Ketten-Knüpfung erforderlich sind.

¹⁾ Auf das Gebiet der »phytochemischen Reduktionen«, das Lintner und v. Liebig zuerst betreten haben, sei in diesem Zusammenhang verwiesen.

Nach allen bisherigen Erfahrungen ist die Wirkung der Carboligase nicht umkehrbar. Das Phenyl-acetyl-carbinol zerfällt weder freiwillig, noch durch biochemische Eingriffe in seine Komponenten. Umdrehbar braucht unser synthetischer Vorgang so wenig zu sein, wie etwa eine rückläufige Vereinigung von Kohlensäure und Weingeist zu Zucker bisher zu erzielen gewesen ist.

Die Carboligase vereinigt den »Acetaldehyd« nicht nur — dem Ausdruck der Formeln nach — mit Benzaldehyd, sondern auch mit anderen Aldehyden. In der aliphatischen Reihe hat Hirsch weitere interessante Fälle dieser Reaktion verwirklicht. Er zeigte, daß z. B. bei Vergärung der Brenztraubensäure für sich unter geeigneten Bedingungen außer Acetaldehyd auch dessen Acyloin, das Methyl-acetyl-carbinol, $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$, auftritt.

Der Zusammenschluß zweier Aldehyde zu einem Ketol ist sehr bemerkenswert, ebenso wie die Tatsache, daß dieser der Zucker-Zerlegung sozusagen entgegengesetzte Vorgang wieder zu Brenztrauben-Derivaten, nämlich zu Substitutionsprodukten des Brenztraubenalkohols, führt. Die zugegebenen fremden Aldehyde ziehen aus der Reihe der Zucker-Zerfallsprodukte das Glied des Acetaldehyds heraus und fixieren es als ein Acyloin. Hierdurch repräsentiert sich die Erscheinung als eine neue, und zwar fünfte Vergärungsmöglichkeit.

Damit fällt ein anderes helles Licht wiederum auf Acetaldehyd und Brenztraubensäure. Durfte letztere bisher als Muttersubstanz bestimmter Abbau-Erzeugnisse, nämlich des Acetaldehyds, des Äthylalkohols, des Kohlendioxyds und der Essigsäure gelten, so erweist sie sich nunmehr auch als die Quelle kohlenstoffreicherer Keton-alkohole, und wenn man der zuvor erwähnten Buttersäure-Gärung gedenkt, auch als Erzeuger der Butylderivate. Die Brenztraubensäure ist ein Produkt der biochemischen Spaltung und zugleich ein Material für die Herstellung von Kohlenstoff-Verkettungen. Sie ist ein bedeutsames Bindeglied zwischen Abbau-Prozessen und kern-synthetischen Vorgängen.

Ganz kurz sei noch erwähnt, daß auch im Tierkörper carboxylase-artige Fermente tätig sein dürften. Tschernorutzki, P. Mayer sowie neuerdings Stepp haben eine Zerlegung von Brenztraubensäure und der nahe verwandten Oxal-essigsäure durch animalische Organe und Gewebe beschrieben.

Somit hat sich nach mehrfachen Richtungen die Brauchbarkeit des erwähnten Gärungs-Entwurfs erwiesen. Er stellt, sofern man ein Gleichnis gebrauchen will, den weiterzuverfolgenden Versuch zur spektralen Zerlegung des zunächst einheit-

lich erscheinenden Gärungs-Enzyms und -Vorganges dar. Aber in dem entworfenen Regenbogenbilde fehlen noch Bezirke; sie werden sich uns erst enthüllen, wenn »das unzulängliche Glasprisma durch ein vollkommenes Beugungsgitter« ersetzt sein wird. Was dies Paradigma geleistet hat, läßt sich am klarsten vergegenwärtigen, wenn man noch einmal die jetzt erkannten diversen Gärungsformen ins Auge faßt:

Der aus der Brenztraubensäure entstandene Acetaldehyd wird reduziert zum Weingeist bei der gewöhnlichen alkoholischen Zucker-Spaltung. Er wird abgefangen bei der zweiten und dismutiert bei der dritten Vergärungsform, wobei in diesen beiden Fällen der reduktive Ausgleich durch eine äquivalente Bildung von Glycerin gegeben ist. Bei der Zerlegung der Kohlenhydrate durch Mikroorganismen aus der Gruppe der Coli- und Ruhrbazillen erleidet der Acetaldehyd ebenfalls eine Dislokation. Er bzw. seine Vorstufe Brenztraubensäure, werden bei der Buttersäure-Gärung, die eine vierte Vergärungsmöglichkeit darstellt, zunächst aldolisiert und dann durch eine Art Saccharin-Umlagerung in Buttersäure übergeführt. Als eine fünfte Vergärungsart erscheint die carboligatische Reaktion zwischen dem Carboxy-acetaldehyd und verschiedenen Aldehyden; durch sie entstehen Keton-aldehyde, Gebilde mit längeren unverzweigten Kohlenstoffketten.

Eine Frucht der bisherigen Untersuchungen ist auch die Erkenntnis, daß die Natur bei der biochemischen Umwandlung der Kohlenhydrate in vielen Fällen zunächst den gleichen Weg einschlägt. Bei der Brenztraubensäure bzw. beim Acetaldehyd endet die Hauptchaussee, von diesem Knotenpunkt beginnen die Abzweigungen. Einige Straßen senken sich in das Gebiet vollkommenen Abbaus, aber es führen auch Pfadkehren zu Verbindungen mit verlängerten Kohlenstoffketten hinauf.