

383. Emil Fischer und Hans Thierfelder: Verhalten der verschiedenen Zucker gegen reine Hefen.

(Eingegangen am 12. Juli.)

Die älteren Versuche über die Vergärbbarkeit der verschiedenen Zucker sind sämtlich mit der gewöhnlichen Hefe der Bierbrauer ausgeführt. Eine Zusammenstellung der hierbei gewonnenen Resultate findet sich in der Abhandlung von Stone und Tollens in Liebig's Ann. 249, 257. Nach ihrer eigenen Beobachtung ist ausser Traubenzucker und Fruchtzucker die Galactose noch völlig, die Arabinose dagegen gar nicht vergärbbar; auch Sorbose soll von gewöhnlicher Bierhefe, allerdings langsam und unvollständig, vergohren werden. Durch die ausgezeichneten Untersuchungen von Hansen wissen wir jetzt, dass die in der Industrie früher benutzten Hefen sämtlich Gemenge waren, welche durch rationelle Züchtung in eine grössere Anzahl scharf definirter Arten geschieden werden können. Das Verhalten einer Anzahl rein gezüchteter Hefen gegen Traubenzucker, Rohrzucker, Maltose und Milchzucker ist von Hansen selbst geprüft worden. Nach seinen Beobachtungen, welche in der Monographie von A. Jörgensen, die Mikroorganismen der Gährungsindustrie, S. 131 zusammengestellt sind, hat man es bei den Saccharomyceten mit 3 verschiedenen Klassen zu thun, von welchen die erste und zahlreichste ausser dem Traubenzucker auch Rohrzucker und Maltose vergährt; dahin gehören die Arten *Saccharomyces cerevisiae* I, *S. Pastorianus* I, II, III, *S. ellipsoideus* I, II. Die zweite Klasse umfasst die Arten, welche Trauben- und Rohrzucker, aber nicht die Maltose vergähren (*S. Marxianus*, *S. Ludvigii*, *S. exiguus*). Die dritte Klasse wird nur von einer einzigen Species (*S. membranaefaciens*) repräsentirt, welche auffallenderweise überhaupt keine alkoholische Gährung verursacht. Milchzucker wird von keinem der erwähnten Saccharomyceten verändert. Von sonstigen Erfahrungen auf diesem Gebiete ist hervorzuheben, dass *S. apiculatus* Traubenzucker, *d*-Mannose und *d*-Fructose (Cremer¹⁾), aber nicht Galactose (F. Voit²⁾) und ebenso wenig Rohrzucker, Milchzucker und Maltose (Hansen, Amthor³⁾) vergährt. Endlich wurden von Duclaux⁴⁾, Adametz⁵⁾, Grotenfelt⁶⁾, Beyerinck⁷⁾,

¹⁾ Zeitschr. f. Biol. 29, 525.

²⁾ Zeitschr. f. Biol. 29, 149.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 12, 563.

⁴⁾ Annal. Institut. Pasteur 1, 573.

⁵⁾ Centralbl. f. Bact. u. Parask. 5, 116.

⁶⁾ Fortschr. der Mediz. 1889, 121.

⁷⁾ Centralbl. f. Bact. u. Parask. 6, 44.

Kayser¹⁾ noch einige Hefen beschrieben, welche den Milchzucker vergähren.

Alle zuvor erwähnten Angaben beschränken sich auf die natürlichen Zucker. Ueber das Verhalten der übrigen synthetisch gewonnenen Producte liegen bisher nur Beobachtungen vor, welche mit Benutzung gewöhnlicher Bierhefe angestellt wurden²⁾. Dieselbe lässt unverändert die optischen Antipoden des Traubenzuckers, Fruchtzuckers, der Mannose, der Galactose, sowie die beiden optisch isomeren Gulosen; sie verändert ebenso wenig die verschiedenen Hep-tosen und Octosen, dagegen vergährt sie die Mannononose³⁾ und Glycerose, während die nahe verwandte Glucononose⁴⁾ wieder nicht gährungsfähig ist.

Wie die Zusammenstellung zeigt, ist das Beobachtungsmaterial bei Weitem am grössten bei den Hexosen und führt hier zu dem Schluss, dass die Gährfähigkeit in naher Beziehung zum geometrischen Bau des Moleküls steht, mithin geradezu als eine stereochemische Frage bezeichnet werden darf.

Von diesem Gesichtspunkt aus schien es uns erwünscht, die früheren Versuche mit rein gezüchteten Hefen zu wiederholen und noch auf einige andere Zucker auszudehnen.

Wir benutzen dafür 12 verschiedene Hefen. Die 8 Arten *S. cerevisiae* I, *S. Pastorianus* I, II, III, *S. ellipsoideus* I, II, *S. Marxianus*, *S. membranaefaciens* wurden uns von Hrn. E. Chr. Hansen in freundlichster Weise zur Verfügung gestellt. 2 weitere verdanken wir dem Vorstande der Versuchs- und Lehrbrauerei in Berlin. Die eine als »Brauereihefe«⁵⁾, die andere als »Brennereihefe«⁶⁾ bezeichnet, sind beide von P. Lindner isolirt worden. Eine 11te, energisch wirkende Art wurde uns als *S. productivus* von Hrn. Beyerinck in Delft gütigst überlassen; endlich haben wir eine morphologisch noch nicht scharf definirte Species geprüft, welche Milchzucker leicht vergährt und deshalb im Folgenden als Milchzuckerhefe bezeichnet wird.

Da die Bereitung der künstlichen Zucker zum Theil recht mühsam ist und die Versuche vielfach variirt werden mussten, so

1) Annal. Institut. Pasteur 1891, 395.

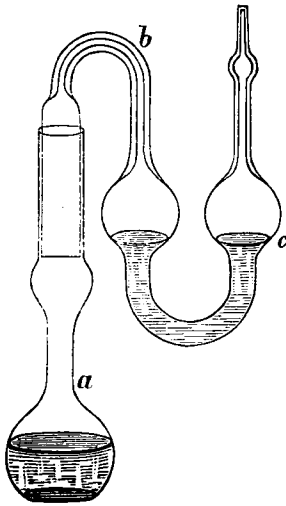
2) E. Fischer, diese Berichte 23, 375, 389, 2620, 2230, 2234; 24, 533, 527; 25, 1259.

3) E. Fischer, diese Berichte 23, 2238.

4) Ann. Chem. Pharm. 270, 106.

5) Sie ist in der Literatur als Hefe No. 19 oder als Hefe Froberg beschrieben, vergl. Irmisch, Wochenschrift f. Brauerei 1891, No. 39 — 46, P. Lindner, ebenda 1893, 692; 1894, 381.

6) Sie ist in der Literatur als Hefe No. 128, Rasse 2 bekannt; vergl. Zeitschr. f. Spiritusindustr. 1892. 304.



Natürliche Grösse

haben wir zur Ersparung von Material ein kleines Gährgefäss von beistehender Form benutzt. Das Kolfchen a, welches einen Inhalt von ca. 1 ccm hat, wurde mit Wattebausch verschlossen, sterilisirt und darauf zu 2 Dritteln mit einem Gemisch gefüllt, welches aus gleichen Volumina 20 procentiger, wässriger Zuckerslösung und Hefedecoct bestand. Das letztere war aus gut gewaschener und scharf abgepresster, reiner Hefe durch Kochen mit der vierfachen Menge Wasser und wiederholtes Filtriren gewonnen und mit einer kleinen Menge Citronensäure versetzt. Zu der sorgfältig sterilisirten Flüssigkeit wurde dann mit Hülfe eines mit Oese versehenen Platindrahtes von der auf Bierwürzelgelatine rein cultivirten Hefeart ungefähr 0.013 g unter den üblichen Cautelen zugesetzt und das Gährkolfchen durch Aufsetzen des ebenfalls sterilisirten und bis zur Marke c mit Barytwasser gefüllten Ableitungsrohres b geschlossen. Da der Aufsatz in den Hals des Gährgefässes eingeschliffen war, so konnte durch Einreiben mit etwas Vaseline und Aufgiessen von Paraffin leicht ein luftdichter Verschluss erzielt werden. Die so beschickten Apparate blieben dann 3—10 Tage im Brutschrank bei einer Temperatur von 24—28° stehen.

In allen Fällen, auch wenn der Zucker nicht gährbar ist, beobachtet man bei dieser Versuchsanordnung die Entwicklung einer kleinen Menge von Kohlensäure, welche die Oberfläche des absperrenden Barytwassers mit einer dünnen Schicht von Carbonat überzieht. Da diese Erscheinung sogar dann eintritt, wenn kein Zucker in der Flüssigkeit enthalten ist, so wird sie offenbar von der geringen Menge von Kohlenhydrat veranlasst, welches in der Hefe selbst und in dem aus ihr bereiteten Decoct vorhanden ist. Ganz anders gestaltet sich der Vorgang, wenn das Material leicht gährbar ist. Das vorgelegte Barytwasser wird nicht allein sehr stark getrübt, sondern auch völlig durch den Ueberschuss der Kohlensäure neutralisirt und schliesslich verschwindet der Zucker ganz. In der Mitte stehen diejenigen Fälle, wo das Material erst in gährungsfähigen Zucker verwandelt werden muss, wie bei den später erwähnten Beispielen von Glucosiden, und wo infolgedessen die Gärung langsam erfolgt und mit einer beschränkten Menge von Hefe wahrscheinlich nicht zu Ende geführt werden kann. Indessen ist auch hier die Menge der entwickelten Kohlensäure immer so gross, dass man über den wirklichen Eintritt der Gärung nicht im Zweifel sein kann.

Tabelle¹⁾.

	d-Mannose	d-Fruktose	d-Galactose	d-Talose	l-Mannose	l-Gulose	Sorbose	l-Arabinose	Rhamnose	α-Glucoheptose	α-Glucoctose	Rohrzucker	Maltose	Milchzucker	Methyl- glucosid ²⁾	Aethyl- glucosid ²⁾	Glucose- resorcin	Glucose- pyrogallol	Glucoseäthyl- mercaptal
S. Pastorianus I . . .	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+	—	—	—	—
S. Pastorianus II . . .	+++	+++	+++ ³⁾	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+	—	—	—	—
S. Pastorianus III . . .	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+	—	—	—	—
S. cerevisiae I . . .	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+	—	—	—	—
S. ellipsoideus I . . .	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+	—	—	—	—
S. ellipsoideus II . . .	+++	+++	+++ ³⁾	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+	—	—	—	—
S. Marxianus . . .	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+	—	—	—	—
S. membranaefaciens . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Brauerhefe . . .	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+	—	—	—	—
Brennerhefe . . .	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+	—	—	—	—
S. productivus . . .	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+++	—	+	—	—	—	—
Milchzuckerhefe . . .	++	+++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—	—	—	—

1) Erklärung der Zeichen:

+++ bedeutet keine Reduction der Fehling'schen Lösung nach 8 Tagen, also vollständige Vergärung.

++ » eine ganz schwache Reduction nach 8 Tagen, also fast vollständige Vergärung.

+ » deutliche Reduction nach 8 Tagen, aber unzuverlässige Gärung.

— » keine Gärung.

2) Die Prüfung auf völlige Vergärung wurde hier unterlassen, da der Nachweis der Glucoside, welche erst nach der Hydrolyse reduciren, durch die Anwesenheit des Hefeglycogens zu sehr erschwert wird.

3) Nach 14 Tagen war der Zucker ganz verschwunden.

Von Monosacchariden kamen zur Verwendung: *d*-Mannose, *d*-Fructose, *d*-Galactose, *d*-Talose, *l*-Mannose, *l*-Gulose, Sorbose, *l*-Arabinose, α -Glucoseptose, α -Glucoseoctose, von Disacchariden Rohrzucker, Maltose und Milchzucker. Anhangsweise haben wir noch Methyl- und Aethylglucosid¹, sowie Glucose-Resorcin, Glucose-Pyrogallol und Glucoseäthylmercaptopal in einigen Fällen geprüft. Die *d*-Glucose ist so oft Gegenstand der Untersuchung gewesen, dass wir sie nicht in den Kreis unserer Experimente zogen.

Soweit die Versuche Wiederholungen älterer darstellen, ergibt sich eine völlige Uebereinstimmung unserer Resultate und der früheren Beobachtungen.

Nur in Bezug auf die Sorbose besteht ein Widerspruch; sie erwies sich als gährungsunfähig, während Stone und Tollens ihr ein allerdings unvollkommenes Gährungsvermögen zuschreiben. Der Grund für das abweichende Resultat von Stone und Tollens wird in der Thätigkeit von Spaltpilzen, welche der Hefe beigemischt waren, zu suchen sein. Reine Hefe lässt Sorbose unberührt.

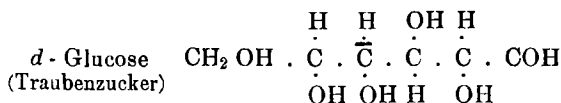
Die negativen Ergebnisse der Versuche mit Glucose-Pyrogallol, Glucose-Resorcin, Glucoseäthylmercaptopal sind nicht etwa auf eine Schädigung der Hefe durch freigewordenes Pyrogallol u. s. w. zurückzuführen; denn, als nach einigen Tagen den Kölbchen etwas Traubenzucker zugefügt wurde, trat alsbald lebhafte Gährung ein.

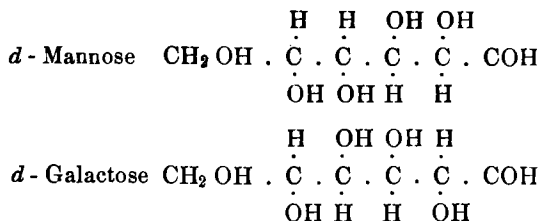
Auffallend ist das Verhalten der Milchzuckerhefe, welche den Milchzucker leicht und vollständig, dagegen die Galactose langsam und innerhalb 8 Tagen nur theilweise vergohren hat.

Aus den angeführten Thatsachen ergibt sich, im Verein mit den älteren Beobachtungen, dass von den 9 bekannten Aldoheptosen 2, die *d*-Glucose und die *d*-Mannose sehr leicht, die *d*-Galactose etwas schwerer vergährbar ist. Bei allen übrigen war keine Wirkung der Hefe zu bemerken. Ebenso scharf ist der Unterschied bei den Ketonen, wo nur die *d*-Fructose gärfähig ist, während Sorbose und nach früheren Versuchen auch *l*-Fructose unverändert bleiben.

Da die Configuration aller dieser Zucker mit Ausnahme der Sorbose festgestellt ist, so lässt sich ihre Beziehung zur Gärfähigkeit mit Benutzung der chemischen Formeln darstellen. In den nachstehenden Betrachtungen ist die *d*-Fructose nicht mehr berücksichtigt, da sie geometrisch mit dem Traubenzucker zusammenfällt.

Die Configurationsformeln der drei gärfähigen Aldosen sind:





Weitere Veränderung in der Stellung der Hydroxyle an den vier asymmetrischen Kohlenstoffatomen hebt das Gährvermögen auf. Ein treffliches Beispiel dafür bietet die *d*-Talose, welche zur Galactose in demselben Verhältniss steht, wie die Mannose zur Glucose. Da aber schon Galactose schwieriger vergährt, als die beiden anderen, so genügt die kleine weitere geometrische Verschiebung, um der Talose das Gährvermögen gänzlich zu nehmen. Die Hefen sind mithin in Bezug auf die Configuration des Moleküls sehr wählerisch; aber die Mehrzahl derselben zeigt den gleichen Geschmack, nur einige sind besonders empfindlich, wie *S. apiculatus*, welcher sogar die Galactose verschmäht. Dieses Resultat muss umsomehr überraschen, als dieselben Hefen von viel grösseren Veränderungen des Moleküls nicht berührt werden, da sie ja, wie aus den älteren Versuchen bekannt ist, die Glycerose und die Mannonose vergären.

Dass Mikroorganismen allgemein von zwei optisch isomeren Verbindungen die eine Form bevorzugen, ist durch die Untersuchungen von Pasteur und Anderen längst bekannt; aber bei den Hefen und Zuckerarten liegt doch die Sache etwas anders, da es sich hier nicht allein um den Gegensatz zwischen optischen Antipoden handelt, sondern von einer grossen Anzahl geometrischer Formen nur einige dem Bedürfniss der Zelle Genüge leisten. Dieselbe Beobachtung wird man voraussichtlich auch bei anderen Mikroorganismen, ferner in anderen Gruppen organischer Substanzen wiederfinden, und vielleicht sind sehr viele chemische Prozesse, die im Organismus sich abspielen, von der Geometrie des Moleküls beeinflusst. Unter diesen Umständen lohnt es sich wohl, der Ursache jener Erscheinung nachzuspüren, und es liegt nahe, die Erklärung zunächst auf stereochemischem Gebiet zu suchen.

Unter den Agentien, deren sich die lebende Zelle bedient, spielen die verschiedenen Eiweisssubstanzen die Hauptrolle. Sie sind ebenfalls optisch activ, und da sie aus den Kohlenhydraten der Pflanze synthetisch entstehen, so darf man wohl annehmen, dass der geometrische Bau ihres Moleküls, was die Asymmetrie betrifft, im Wesentlichen dem der natürlichen Hexosen ähnlich ist. Bei dieser Annahme wäre es nicht schwer zu verstehen, dass die Hefezellen mit ihrem asymmetrisch geformten Agens nur in die Zuckerarten

eingreifen und gährungsregend wirken können, deren Geometrie nicht zu weit von derjenigen des Traubenzuckers abweicht. Allerdings bestehen auch für die natürlichen Hexosen feine Unterschiede in dem Protoplasma der einzelnen Hefen, wie namentlich das Verhalten des *S. apiculatus* gegen Galactose beweist. Diese Erfahrung deutet darauf hin, dass Gewöhnung oder Zuchtwahl die Gährwirkung einer Hefenart verändern können, und wir haben selbst den kühnen Versuch unternommen, eine solche chemische Umzüchtung vorzunehmen.

S. Pastorianus I. wurde mit Hefedecoct als Nährmaterial und einem Gemisch von *l*-Mannose und Traubenzucker in der früher beschriebenen Weise behandelt und nach je 2, 3 oder 8 Tagen die Flüssigkeit erneuert. Dabei wurde die Menge des Traubenzuckers, welche anfangs 50 pCt. des gesammten Zuckers betrug, immer mehr verringert. Die Hefe vermehrte sich unter den gegebenen Bedingungen recht gut und vergährte den Traubenzucker, selbst wenn seine Menge auf 0.5 pCt. der gesammten Lösung herabgemindert war, mit Leichtigkeit. Sobald aber derselbe ganz fehlte, blieb auch jede Gährwirkung aus. Die *l*-Mannose wurde also auch trotz der Gelegenheit zur Anpassung, welche der Hefe im Laufe von 3 Monaten und manchem Generationswechsel geboten war, nicht angegriffen und das Resultat des Versuchs ist ein rein negatives. Das schliesst aber nicht aus, dass derselbe unter veränderten Verhältnissen wiederholt erfolgreich ausfällt.

384. C. Liebermann: Weitere Untersuchungen über die Allozimmtsäure.

(Vorgetragen in der Sitzung vom 25. Juni vom Verfasser.)

Der Antheil der Abfallsäuren aus der technischen Spaltung der Cocainnebenalkaloide, welcher mir bisher hauptsächlich zur Allozimmtsäuredarstellung gedient hatte und eine dunkle, halbflüssige, theerige Masse darstellt, wurde diesmal der Winterkälte ausgesetzt und der dabei fest ausgeschiedene Antheil durch Absaugen beseitigt. Dadurch war das rückständige Oel derartig an Allozimmtsäure angereichert¹⁾, dass letztere nach einem gegen früher sehr vereinfachten Verfahren gewonnen werden konnte.

Zu dem Zwecke wurde das Oel mit seinem 6—8fachen Volumen Ligroin ausgeschüttelt, die abgehobene Ligroinlösung, welche jetzt die

¹⁾ Das Oel enthält ca. 10 pCt. Allozimmtsäure, neben einigen anderen Säuren, und hauptsächlich Ester der Zimmtsäure, Allozimmtsäure u. A.