

angeschüttelt, die vereinigte ätherische Lösung mittels Chlorcalcium getrocknet und in vacuo fractionirt; genauere Daten werden später gegeben werden, da die vorhandene Menge zur sicheren Bestimmung des Siedepunktes nicht mehr ausreichte.

$C_3H_4O_3$. C 40.91, H 4.55.
» 40.58, » 4.59.

Die hier beschriebenen Verbindungen sollen nach verschiedenen Richtungen hin weiter untersucht werden.

450. Allan Maofadyen, G. Harris Morris und Sidney Rowland:

Ueber ausgepresstes Hefezellplasma (Buchner's »Zymase«).

[Erste Mittheilung.]

(Eingegangen am 6. Juli.)

Einleitung¹⁾.

Im Jahre 1897 erschien von Hrn. Prof. E. Buchner eine Mittheilung, in welcher derselbe eine Methode beschrieb, mit deren Hülfe es ihm, wie er behauptet, gelang, das active Ferment der alkoholischen Gährung aus der Hefezelle zu isoliren und dessen Einwirkung auf

1)		Literaturübersicht.			
E. Buchner,		diese Berichte	30	[1897],	117.
»		»	»	»	1110.
»	und Rapp,	»	»	»	2668.
»	»	»	31	[1898],	209.
»	»	»	»	»	568.
»	»	»	»	»	1084.
»	»	»	»	»	1090.
»	»	»	»	»	1531.
»	»	»	32	[1899],	127.
»	»	»	»	»	2086.
»	» Albert,	»	33	[1900],	266.
Abeles,		»	31	[1898],	2261.
Geret und Hahn,		»	»	»	2335.
Albert,		»	32	[1899],	2372.
Cremer,		»	»	»	2062.
Hahn,		»	31	[1898],	200.
Wróblewski,		»	»	»	3218.
»	Anzeiger d. Acad. d. Wiss. Krakau,				1899, 115.
»	Centralbl. f. Physiologie,				» 284.
Will,	Zeitschr. f. d. gesammte Brauwesen,				» 132.
Reynolds Green,	Ann. of Botany,		XI	[1897],	555.
»	»		XII	[1898],	491.
Martin und Chapman,	Proc. Physiolog. Soc.		11.	Juni 1898.	

vergärbare Zucker zu zeigen. Seitdem hat Buchner, vornehmlich in Verbindung mit Rapp, von Zeit zu Zeit über seine weiteren Untersuchungen in dieser Richtung berichtet. Diese Untersuchungen, welche noch fortgesetzt werden, betrachtet Buchner als Bestätigungen des von ihm schon aus seinen ersten Experimenten gezogenen Schlusses, dass nämlich die Wirksamkeit der Hefezelle als alkoholisches Ferment abhängt von der Thätigkeit eines löslichen Enzyms von Albuminoid-Charakter, welches von der lebenden Zelle producirt wird. Diesem löslichen Ferment gab Buchner den Namen »Zymase«.

Buchner's Untersuchungen haben natürlich die grösste Aufmerksamkeit erregt und eine beträchtliche Anzahl von Kritikern hervorgerufen. Und in der That würden auch seine Resultate, falls allgemein angenommen, manch' eine Fundamentalvorstellung, welche bisher bezüglich der Gärung Geltung hatte, umstürzen.

Seit Langem waren zwei Theorien über die alkoholische Gärung im Umlauf, die von ausgezeichneten Gelehrten vertreten wurden: Von der einen Theorie wird die alkoholische Gärung als ein vitaler oder physiologischer Act angesehen (Pasteur u. A.), von der anderen dagegen auf die Thätigkeit eines Enzyms zurückgeführt (Liebig u. A.). Die erstere oder vitale Theorie konnte nicht widerlegt werden, so lange es nicht gelang, das hypothetische Enzym aus der Hefezelle abzuscheiden. Letzteres will nun Buchner mit Hülfe einer besonderen Methode erreicht haben, deren wesentliche Punkte die folgenden sind: Die Hefezellen werden von dem anhängenden Wasser befreit, indem man dieselben einem Druck von 50 Atmosphären aussetzt. Dann wird die Masse mit dem gleichen Gewicht Quarzsand und einem Fünftel ihres Gewichts Kieselguhr vermischt. Hierauf wird das Ganze in einer Porzellanschale verrieben, bis es feucht und plastisch geworden ist, zum Zeichen, dass die Hefezellen zerstört wurden und ein gewisser Theil ihres Plasmas ausgetreten ist. In diesem Zeitpunkt liess sich feststellen, dass 40 pCt. der Hefezellen zerrissen waren. Der plastische Teig wurde nunmehr einem Druck von 500 Atmosphären unterworfen und lieferte hierbei eine beträchtliche Menge Presssaft. Nach Verlauf von 2 Stunden wird der restirende Kuchen zerkleinert, mit Wasser vermischt, von Neuem zerrieben und nochmals ausgepresst. So wird eine weitere Quantität Zellplasma gewonnen. Die Gesamtausbeute aus 1000 g Hefe betrug ungefähr 500 ccm Flüssigkeit, von welchen 140 ccm aus zugefügtem Wasser bestanden. Grössere oder kleinere Ausbeuten an Zellplasma können je nach der Beschaffenheit der Hefe und der Art des angewandten mechanischen Verfahrens erzielt werden. Die erhaltene Flüssigkeit wird in ein abgekühltes Gefäss filtrirt. In dem zurückbleibenden Kuchen fanden sich noch etwa 4 pCt. unveränderter Zellen und ungefähr 60 pCt. leere Zellgehäuse. Der frisch bereitete Presssaft war von gelblicher

Farbe, opalescirte schwach oder war im durchfallenden Licht fast klar und besass Hefe-Geruch. Die Flüssigkeit enthielt beträchtliche Mengen gelösten Kohlendioxyds, welches zu entweichen begann, sobald die Temperatur auf 40^o gesteigert wurde; sie enthielt ferner coagulirbare Eiweissstoffe und verwandelte sich beim Erhitzen in eine praktisch feste Masse.

Es braucht kaum hinzugefügt zu werden, dass der ausgepresste Zellsaft complexer Natur ist und die sehr verschiedenartigen Bestandtheile des Hefezellplasmas enthält. Buchner fand in demselben, neben anderen Körpern, Invertase, eine Maltase, ein Glykogen-Ferment, Oxydase (?) und ein actives, proteolytisches Enzym, welches eine deutliche Selbstverdauung der Eiweissbestandtheile des Presssaffes hervorrief. Die specifischen Eigenschaften des Presssaffes als alkoholisches Ferment sind nach Buchner auf ein lösliches Enzym — die »Zymase« — zurückzuführen, dessen Thätigkeit zu demonstrieren er leicht im Stande war. Wird z. B. ein gleiches Volumen 50-procentiger Rohrzucker-Lösung zu 100 ccm frischen Presssaffes hinzugefügt, so tritt Gasentwicklung ein, und dies geschieht noch schneller, wenn 5 g gepulverter Rohrzucker direct in 15 ccm Presssaft gelöst werden. Aus einer Lösung von 4 g Rohrzucker in 15 ccm Presssaft entwickelten sich innerhalb 14 Stunden 50 ccm Kohlendioxyd. Ungefähr 4—5 g Kohlendioxyd wurden aus 100 ccm des Presssaffes gewonnen. Die besten Resultate wurden im Winter erzielt. Um eine eventuelle Wirkung von Bacterien oder lebenden Hefezellen auszuschliessen, wurden den Controllproben 2 pCt. Kaliumarsenit zugefügt, bei späteren Versuchen fanden auch andere Antiseptica, z. B. Thymol und Toluol, Verwendung.

Es muss erwähnt werden, dass die Beobachtungen, sowohl experimenteller als theoretischer Natur, welche andere Autoren gemacht haben, in der Hauptsache Buchner's Auffassung nicht bestätigen. Die Unbeständigkeit des ausgepressten Zellsaftes, seine wechselnde Wirkung und der gewöhnlich schnelle Verlust der specifischen Gähkraft stimmen besser mit dem Verhalten von lebendem Protoplasma, als mit der Thätigkeit einer Substanz überein, welche die gewöhnlichen Eigenschaften der Enzyme besitzt. Die Theorie, dass das Phänomen eine Phase in der Thätigkeit des Protoplasmas selbst bedeutet, hat deshalb zahlreiche Anhänger gefunden (Abeles, Wróblewski). Die Thatsache, dass Chloroform die Gährung nicht verhindert und dass das wirksame Princip durch ein Berkefeld-Filter geht, sind andererseits weitere, von Buchner zu Gunsten seiner Enzym-Theorie erbrachte Beweise; doch kann man bei dem jetzigen Stande der Versuche nicht sagen, dass die Frage im Sinne Buchner's entschieden sei.

Experimentelles.

Der Gegenstand bietet in so mancher Hinsicht nicht nur ein specielles, sondern auch allgemeines biologisches Interesse, dass wir uns veranlasst sahen, seine Untersuchung fortzusetzen. Wir begannen unsere Arbeit in der ausgesprochenen Absicht, die Resultate, welche Buchner mit dem ausgepressten Hefezellplasma gewonnen hat, einer experimentellen Prüfung zu unterziehen. Wir hielten dies für um so nöthiger, als Buchner seine Experimente ausschliesslich mit untergähriger Hefe angestellt hat, und es von Interesse sein musste, festzustellen, ob die obergährige Hefe, welche in den englischen Brauereien verwendet wird, die gleichen Resultate geben würde. Wir wollen jedoch gleich hier feststellen, dass wir unsere Ergebnisse im Wesentlichen vom experimentellen Standpunkt aus verwerthen wollen, und dass wir zunächst darauf verzichten, aus denselben irgend welche theoretischen Schlussfolgerungen zu ziehen, da nach unserer Meinung das bisher Erreichte ein derartiges Beginnen nicht rechtfertigen würde. Wir möchten nur noch hinzufügen, dass wir unsere Untersuchung fortführen und die weiteren Resultate derselben zum Gegenstand einer zweiten Mittheilung machen werden.

Die unerwarteten Schwierigkeiten, denen wir begegneten, und die verschiedenartigen Thatsachen, welche zur Beobachtung gelangten, machten das Arbeiten in einer streng inne zu haltenden Richtung unmöglich. Bezüglich ihres Einflusses auf den Hauptvorgang waren speciell folgende Factoren zu beachten: die freiwillige Gährung des Hefeplasmas, die Verunreinigungen der Brauerei-Hefe, der Einfluss der Temperatur, das Alter und die Race der Hefe, die Wirkung von Hefe-Reinculturen u. s. w. Unsere Experimente wurden im Wesentlichen unter den gleichen Bedingungen wie die von Buchner ausgeführt, und unsere Untersuchungen sind deshalb in dieser Hinsicht von ähnlichem Charakter wie die seinigen.

Die Methode der Darstellung des Hefezellplasmas ist die Grundlage einer derartigen Untersuchung und nahm deshalb unsere ganz besondere Aufmerksamkeit in Anspruch, um so mehr, als ein in dieser Richtung gemachtes Versehen die ganze Arbeit mit Fehlern behaften musste. So nimmt auch Buchner an, dass Unvollkommenheiten bei der Auspressung der Zellen den Misserfolg anderer Autoren erklären. Im Anfang schlossen wir uns eng an das Buchner'sche, oben beschriebene Verfahren zum Auspressen der Zellen an, aber schliesslich wurden wir nach vielen Versuchen zu der folgenden Anordnung des Apparates geführt, die eine schnellere Gewinnung des Zellplasmas oder Presssaftes gestattet.

Darstellung des Zellplasmas.

Die Hefe bildet, wie man sie aus der Brauerei erhält, eine dicke, feuchte, schaumige Masse, die aus Hefezellen besteht, vermischt mit mehr oder weniger vergohrenen Würzen. Für die Zwecke dieser Untersuchung mussten die Hefezellen von allen anhängenden Stoffen, deren Gegenwart die Zusammensetzung des ausgepressten Saftes beeinflussen konnte, befreit werden. Die als vorbereitende Operation mithin nothwendige Reinigung der Hefe wurde in folgender Weise vorgenommen:

Gleiche Theile roher Hefe und Wasser wurden vermischt und mit einander verrührt. Die so erhaltene Suspension der Hefezellen wurde dann centrifugirt, wobei die in derselben enthaltenen Zellen sich am Boden des Gefässes als dicke Rahmmasse ansammelten. Die darüber stehende Flüssigkeit wurde decantirt und die Zellen mit einer neuen Menge Wasser nochmals zur Suspension verrieben. Die Mischung wurde wiederum centrifugirt und der Process wiederholt, bis das Wasser völlig klar und farblos abliefl. Das schliesslich gewonnene Product bildete eine feste Masse von Hefezellen, die eng an einander gelagert waren und nur eine geringe Menge anhängenden Wassers enthielten. Um einen Hefepresssaft von völlig natürlicher Zusammensetzung zu erzielen, wurde auch die kleine Quantität anhängenden Wassers entfernt, indem die Hefemasse mit einer doppelten Schicht von »Hydraulischem Pressen-Tuch« umhüllt und auf eine Reihe flacher, eiserner Schalen vertheilt wurde, die so construirt waren, dass sie, auf einander geschichtet, in einer hydraulischen Presse stark gepresst werden konnten, während die ausgedrückte Flüssigkeit abliefl. Durch diese Vorrichtung, welche eine modificirte Form der Filterpresse darstellt, wurden die letzten Antheile des anhängenden Wassers entfernt. Die von dem Tuch abgelöste Hefemasse bildete ein weisses Pulver, das aus Hefezellen von annähernd trockenem Aussehen bestand. Um dieses Resultat zu erzielen, war die Anwendung eines Druckes von 70—100 Atmosphären erforderlich.

Die Zerkleinerung der Hefezellen, die nunmehr vorzunehmen war, wurde durch eine mechanische Vorrichtung bewirkt, welche die Hefe zusammen mit zugefügtem Silbersand in einem Zustand heftiger Bewegung erhielt, sodass durch die schnell auf einander folgenden Zusammenstösse der Hefe- und Sand-Theilchen die Zellwandungen zerrissen wurden und der Zellinhalt heraustrat⁴⁾.

⁴⁾ Die genaueren Details dieser Vorrichtung, welche auch mit Erfolg für die Zerkleinerung von Mikroorganismen, inneren Organen, Drüsen und Muskelfasern verwendet wurde, sollen den Gegenstand einer besonderen Mittheilung bilden.

Beobachtet man die trockne Masse aus Hefe und Sand bei ihrer Zerkleinerung, so bemerkt man, dass sie schnell teigig wird und dann durch mehrere Stadien der Klebrigkeit hindurch einen vollkommen flüssigen Zustand erreicht. Die mikroskopische Prüfung der Masse am Schluss des Processes liess keine unversehrten Zellen mehr erkennen. Während der Durchführung dieses Processes und ebenso während der Zeit, die vom Zerreißen der ersten Zellwandung bis zur Prüfung des Endproductes verstrich, wurde das Material durch Circulirenlassen einer Salzsoole abgekühlt, die man durch Expansion flüssigen Ammoniaks bei einer Temperatur von -5° erhielt. Hierdurch liess sich eine Erwärmung der zu zerkleinernden Masse über $+15^{\circ}$ verhüten.

Wird diese Vorsichtsmaassregel nicht getroffen, so erhebt sich die Temperatur der Masse, in Folge der mechanischen Wärmeproduction durch das Zusammenstossen und die Reibung der Substanztheilchen an einander, bis nahe zum Siedepunkt.

Nummehr galt es, den herausgetretenen Zellsaft von den in ihm suspendirten Zellwänden zu trennen. Dies liess sich erreichen durch eine Wiederholung des Processes, mit Hülfe dessen das anhängende Wasser von der ursprünglichen Hefe entfernt worden war. Um die Masse soweit consistent zu machen, dass sie ausgepresst werden konnte, wurde sie mit Kieselguhr vermischt (Buchner gebrauchte bekanntlich diese Substanz im Gemisch mit Sand zum Zerreiben der Zellen). Die zugesetzte Kieselguhr diente gleichzeitig als Filtermaterial und ermöglichte es, aus der teigigen Masse wie aus einem Schwamm eine völlig klare, opalescirende Flüssigkeit auszupressen, in welcher suspendirte Theilchen nicht wahrzunehmen waren. Der hierbei angewendete Druck betrug 200–350 Atmosphären

Dies war in seinen wesentlichen Umrissen das Verfahren, welches bei der Darstellung des Presssaftes benutzt wurde, der zu den folgenden Versuchen diente. Nur wenige Punkte bedürfen noch der Erläuterung. Die folgende Tabelle I enthält die Ausbeuten und die specifischen Gewichte der Presssäfte aus verschiedenen Hefeproben, deren Herkunft und Alter ebenfalls notirt sind. Die Tabelle enthält diese Details über jeden Presssaft, den wir mit Hülfe des oben skizzirten Verfahrens gewonnen haben. Wir veröffentlichen diese Tabelle mehr in der Absicht, zukünftigen Bearbeitern dieses Gebietes nützlich zu sein, als um jetzt aus derselben Schlüsse zu ziehen. Man sieht, dass die Ergebnisse recht verschiedenartige gewesen sind; so erkennt man z. B., dass das specifische Gewicht in keiner ersichtlichen Beziehung zu irgend einem der anderen Werthe steht. Uebrigens scheint auch von Letzteren sich keiner einer bestimmten Gesetzmässigkeit unterzuordnen.

Tabelle I. Ausbeute an Presssaft aus verschiedenen Hefen; spec. Gewicht der Presssäfte.

Herkunft der Hefe	Alter beim Zerreiben (in Tagen)	Ausbeute pro 100g Hefe ccm	Spec. Gewicht des Saftes	Herkunft der Hefe	Alter beim Zerreiben (in Tagen)	Ausbeute pro 100g Hefe ccm	Spec. Gewicht des Saftes	Herkunft der Hefe	Alter beim Zerreiben (in Tagen)	Ausbeute pro 100g Hefe ccm	Spec. Gewicht des Saftes
A	1	68	1036	B. Mild Ale	1	0	—		4	15	1075
	2	87	1031		2	23	1050		5	32	1060
A	Frisch	65	1051	B. Mild Ale	6	43	1034		6	32	1051
	3	27	1050	B. Mild Ale	5	37	1046	B. Mild Ale	3	30	1050
A	3	20	1052	B. Mild Ale	1	11	1073		4	13	1060
A	5	42	1013	B. Pale Ale	3	27	1050		5	31	1060
	1	40	1045		4	23	1057	B. Bitter Ale	6	27	1045
	2	41	1037	B. Pale Ale	1	24	1062		7	30	1042
	2	27	1085		2	25	1054	B. Pale Ale	7	33	1040
A	1	50	1048		3	19	1050		8	23	1045
A	1	25	1023	B. Mild Ale	4	16	1060	B. Mild Ale	3	37	1045
	2	43	1045		1	21	1060	B. Mild Ale	3	23	1055
	3	37	1071		2	26	1045		4	8	—
A	1	25	1072		3	24	1040	B. Mild Ale	4	25	1040
	2	30	1072	B. Pale Ale	Frisch	5	—	B. Mild Ale	3	25	1067
A	1	40	1049		2	19	1055	B. Mild Ale	4	21	1060
A	Frisch	11	—	B. Mild Ale	2	28	1045		5	26	1045
	Frisch	21	1080		3	29	1050	B. Mild Ale	1	27	1050
B. Pale Ale	1	31	1078		4	12	1063	B. Bitter Ale	2	25	1050
	3	33	1060	B. Mild Ale	Frisch	0	—		1	32	1040
	4	26	1073		2	14	1046	B. Mild Ale	2	10	1051
	7	31	1070		3	0	—	B. Bitter Ale	3	35	1045
B. Mild Ale	1	34	1056	B. Mild Ale	1	0	—		3	27	1050
	4	34	1059		2	6	—	B. Mild Ale	4	31	1060
B. Mild Ale	2	35	1060	B. Mild Ale	3	13	1060		3	30	1045
B. Mild Ale	2	30	1066		4	35	1060	B. Bitter Ale	3	31	1040
	3	30	1065	B. Mild Ale	2	33	1050		2	26	1040
	5	35	1074		3	8	—	B. Mild Ale	2	30	1060
B. Mild Ale ^c	6	32	1076	B. Mild Ale	1	23	1065		2	27	1055
	7	31	1072		3	27	1072	B. Mild Ale	3	30	1045
					8	0	—	B. Mild Ale	4	23	1040

Bezüglich der Ausbeute an Presssaft ist die Hefe A die ergiebigste, doch werden wir später zu zeigen haben, dass der Presssaft aus dieser Quelle gänzlich ohne Einwirkung auf Zucker war, während er selbst in Folge von Selbstgärung beträchtliche Mengen Kohlendioxyd lieferte. Allgemein wurden die grössten Ausbeuten mit solchen Hefeproben erzielt, die aus den Gährungsgefässen 2—3 Stunden vor dem Zerreiben geschöpft waren. Diese Zeit ist auch diejenige der Maximalthätigkeit bei der Mehrzahl der Presssäfte.

Die folgenden Zahlen mögen zur Erläuterung dienen, wie die Methode in praxi bei einer dem Durchschnitt entsprechenden, erfolgreichen Darstellung arbeitete. Aus 100 g getrockneter und gepresster Hefe wurden 30—35 ccm Presssaft gewonnen. Das Gewicht des zum Zerreiben gebrauchten Sandes betrug 100 g und das Gewicht Kieselguhr, das erforderlich war, um die zerriebene Masse in eine für das Pressen geeignete Consistenz zu bringen, ungefähr 80 g. Das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1050 und 1060. Die Zeit, welche zum vollständigen Zerkleinern der obigen Quantität getrockneter Hefe nöthig war, betrug gewöhnlich 3½ Stunde.

Die physikalischen Eigenschaften des Presssaftes entsprechen genau den von Buchner als charakteristisch angegebenen. Das in dem Saft enthaltene proteolytische Enzym war sehr wirksam und bewirkte eine rasche Verdauung der Eiweissstoffe in der Flüssigkeit.

Gelegentlich ereignet es sich, dass der Saft dem Auspressen aus dem Kieselguhr-Schwamm starken Widerstand entgegensetzt. Dies tritt am häufigsten bei noch ganz frischen Hefen ein, d. h. bei solchen, welche aus den Gährungsgefässen herausgeschöpft und dann direct zur Bereitung des Presssaftes verwendet wurden. Mit einiger Wahrscheinlichkeit wird man diese Schwierigkeiten in Beziehung bringen dürfen zu ähnlichen, denen man bei Versuchen begegnet, den intracellularen Saft aus Organen oder Geweben auszupressen, welche dem lebenden Zustand noch möglichst nahe sind. So giebt z. B. eine Leber, welche einem Hund im Moment des Todes extirpirt und sogleich zerkleinert wird, selbst wenn man den Druck auf tausend Atmosphären und mehr steigert, keinen Saft, während eine nicht so frische Leber sich ohne Schwierigkeiten auspressen lässt. Dass Kieselguhr die Fähigkeit besitzt, den Durchgang gewisser Eiweissstoffe aufzuhalten, ist leicht zu zeigen. Wir fanden z. B., dass Eoglobulin von einem Kieselguhr-Schwamm fast gänzlich zurückgehalten wird, und dass sogar Albumin- und Serum-Proteide bis zu einem gewissen Grade zurückgehalten werden. Es ist deshalb anzunehmen, dass der Presssaft, welcher zu den folgenden Versuchen diente, in jedem Fall zwar weit entfernt war von dem Zustand, in welchem er in der lebenden Hefezelle existirt, dass er jedoch andererseits seinen Lebensbedingungen näher war, als der Presssaft von Buchner, zu

dessen Gewinnung Wasser benutzt wurde; denn Wasser besitzt, wie wir weiter unten zeigen werden, eine bestimmte Wirkung auf unsere Presssäfte. Wir sahen uns also in die schwierige Lage versetzt, den Presssaft unter Verhältnissen, die seinen Lebensbedingungen am nächsten kommen, durch das übliche Verfahren des Auspressens nicht gewinnen zu können. Unter diesen Umständen wird man seine Zuflucht wahrscheinlich zum Centrifugiren nehmen müssen, -aber dieses Verfahren ist äusserst langwierig, und während der Zeit, welche zu seiner Durchführung erforderlich wäre, dürfte der Presssaft bereits seine Zusammensetzung geändert haben. Trotzdem hoffen wir, bald in der Lage zu sein, diese Schwierigkeiten zu besiegen.

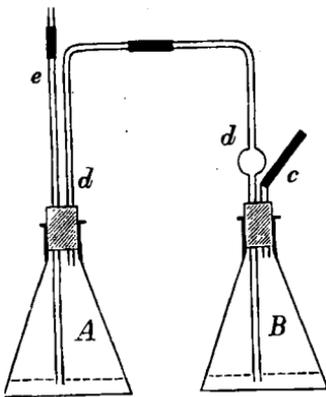
Eigenschaften des Zell-Plasmas.

Im Laufe unserer Untersuchungen verwendeten wir Hefen von fünf verschiedenen Brauereien, die mit A, B, C, D und E bezeichnet werden sollen. Die ersten drei (A, B und C) waren Brauereien im Londoner Bezirk, D eine Brauerei im Süden Englands und E eine der wenigen untergährigen Brauereien dieses Landes. Die grössere Zahl unserer Experimente wurde mit Hefen von A und B angestellt; die Hefen von C, D und E wurden nur zu 1 oder 2 Versuchen gebraucht.

Von Anfang an constatirten wir, dass in praktisch allen Fällen der Hefepresssaft freiwillig Gas entwickelte, sei es, dass er sich selbst überlassen blieb oder mit Zucker vermischt wurde. Unsere Resultate in letzterer Hinsicht erreichten oder übertrafen sogar in einigen Fällen diejenigen von Buchner.

Wir sahen uns jedoch bald der Thatsache gegenüber, dass die Auto- oder Selbst-Gährung des Presssaftes zur Entwicklung eines beträchtlichen Volumens Gas Anlass gab; dieses Volumen übertraf in manchen Fällen sogar dasjenige, welches aus derselben Menge mit Zucker vermischten Presssaftes entwickelt wurde. Diese Selbst-Gährung ist anscheinend der Aufmerksamkeit Buchner's entgangen, welcher auf dieselbe nur gelegentlich in einer seiner Mittheilungen Bezug nimmt und für das von dem Presssaft selbst entwickelte Gas in keinem seiner experimentellen Resultate eine Correctur angebracht zu haben scheint. Die Ausdehnung, in welcher diese Selbst-Gährung Platz greift, ist aus den Tabellen II und IV (S. 2776 und 2777) zu ersehen. Bei einem Versuch z. B. gaben 100 ccm frischer Presssaft nicht weniger als 2.98 g oder 1500 ccm Kohlendioxyd. Diese spontane Gasentwicklung tritt auch ein, wenn der Presssaft bei so niedriger Temperatur aufbewahrt wird, dass er in festem Zustand bleibt. Aller Wahrscheinlichkeit nach verdankt das Gas, welches sich nach Buchner beim Erwärmen der »Zymase« entwickelt, dieser Ursache seine Entstehung.

Bei unseren ersten Versuchen bestimmten wir das Kohlendioxyd, welches der Presssaft für sich oder nach Zusatz von Zucker entwickelte, durch Messen des Volumens gesättigter Kochsalz-Lösung, welches von dem Gas verdrängt wurde; später aber bedienten wir uns einer Modification von Hart's Methode der doppelten Titration, bei welcher das Kohlendioxyd von einer Natriumhydroxyd-Lösung absorbiert wird. Diese Bestimmungen wurden in folgender Weise ausgeführt: Die Menge Presssaft, welche für das Experiment bestimmt war und zwischen 20 und 40 ccm variierte, wurde in einem kleinen Erlenmeyer-Kolben von ungefähr 150 ccm Capacität gebracht. Das zu verwendende Antisepticum wurde zugesetzt und dann die nöthige Menge reinen, trocknen Zuckers, die vorher abgewogen war, in dem Presssaft durch geländes Bewegen gelöst. Der Kolben A (Figur 1) wurde hierauf schnell verschlossen durch einen Kautschuk-



Figur 1.

stopfen, der zweifach durchbohrt war und mit einem zweiten ähnlichen Kölbchen (B) in Verbindung stand. Letzteres enthielt 50 ccm einer 10-procentigen Natronlauge und war ebenfalls mit einem zweifach durchbohrten Stopfen verschlossen. Durch eine der Bohrungen führte das Röhrchen c, welches behufs Fernhaltung der atmosphärischen Kohlensäure vom Kolbeninhalt mit Natronkalk gefüllt war. Durch die zweite Bohrung ging das Rohr d, das in die Flüssigkeit eintauchte und an einer Stelle zur Kugel aufgeblasen war, um die alkalische

Lösung zu verhindern, nach A zurück zu steigen, mit welchem das andere Ende des Röhrchens in Verbindung stand. Das zweite Rohr e des Kölbchens A tauchte bis unter die Oberfläche des Presssaftes ein und war während des Versuchs durch ein Stückchen Gummischlauch und einen Glasstab verschlossen. Der ganze Apparat wurde dann in einen Brutschrank gebracht und bei einer Temperatur von 25° erhalten. Um das entwickelte Kohlendioxyd zu bestimmen, wurden 10 ccm der Alkalilösung mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und mit einigen Tropfen Phenolphthalein vermischt; dann wurde Normalsalzsäure hinzugefügt, bis die Lösung nahezu farblos erschien, und schliesslich mit $\frac{1}{10}$ -Normalsäure völlig entfärbt. Bei diesem Punkte ist alles Aetzalkali neutralisirt und das Carbonat in Bicarbonat verwandelt; hierauf wurden wenige Tropfen Methylorange hinzugegeben und nunmehr mit $\frac{1}{10}$ -Normalsäure titrirt, bis die Flüssigkeit schwach roth gefärbt erschien. Bei Erreichung dieses

Punktes ist das Bicarbonat völlig neutralisirt; durch eine einfache Rechnung lässt sich nunmehr der Betrag an Natriumhydroxyd in den 10 ccm Lösung finden, welcher durch das entwickelte Gas in Carbonat verwandelt worden war. Hieraus ergibt sich dann die Menge Kohlendioxyd, welche von dem Presssaft innerhalb 24 Stunden entwickelt wurde.

Nach Ablauf von 48 Stunden wurde der Apparat aus dem Brutschrank herausgenommen und 15 Minuten Kohlendioxyd-freie Luft hindurchgeleitet, während gleichzeitig das Kölbchen A erwärmt wurde, um das gelöste Gas auszutreiben. 10 ccm der alkalischen Lösung wurden dann, wie oben beschrieben, titrirt und der Gesamtbetrag an entwickeltem Kohlendioxyd aus den Resultaten berechnet. Die Genauigkeit der angewandten Methode ergibt sich aus den folgenden Zahlen, welche bei Versuchen mit dem gleichen Presssaft unter identischen Bedingungen erhalten wurden:

- | | | | | |
|----|------------------|-------|---------|---------------|
| a) | 25 ccm Presssaft | gaben | 0.244 g | Kohlendioxyd, |
| b) | 25 » | » | 0.253 » | » |
| c) | 25 » | » | 0.246 » | » |

Bei den Versuchen zur Ermittlung des Mengenverhältnisses zwischen dem entstandenen Kohlendioxyd und Alkohol absorbirten wir das aus A entweichende Kohlendioxyd in 33-procentiger Kalilauge, welche sich in einem Mohr'schen Kali-Apparat befand, nachdem das Gas zuvor über Chlorcalcium getrocknet war. Der bei diesen Experimenten gebildete Alkohol wurde durch Destillation der Flüssigkeit und Ermittlung des specifischen Gewichts des Destillats bestimmt. Das der Dichte des Destillats entsprechende Gewicht absoluten Alkohols wurde geeigneten Tabellen entnommen.

Bei gewissen Versuchen war es erforderlich, das Kupfer-Reductionsvermögen des mit Zucker vermischten Presssaftes vor und nach der Gärung zu ermitteln. Dies geschah mit Hülfe der Pavy'schen Methode, da es sich als unmöglich erwies, mit Rücksicht auf die große Menge Ammoniak, welche das concentrirte Alkali aus den stickstoffhaltigen Bestandtheilen des Presssaftes entwickelte, das genauere Verfahren von Fehling anzuwenden. Die Pavy'sche Lösung wurde mit reiner Dextrose eingestellt und die Mengen reducirenden Zuckers mit Hülfe dieser Normallösung berechnet. Als Beispiel für die Genauigkeit dieses Verfahrens möchten wir anführen, dass wir bei einem Versuch, bei welchem eine 2.028 g reducirendem Zucker äquivalente Menge Rohrzucker zu 20 ccm Zellsaft hinzugefügt und die Mischung sogleich gekocht wurde, durch Titration mit der Pavy'schen Lösung soviel Zucker fanden, als 2.162 g Dextrose entspricht.

Wenn wir Gelegenheit hatten, die optische Activität der Lösungen zu bestimmen, bedienten wir uns des Halbachatten-Polarimeters von Schmidt & Haensch.

Controllversuche wurden in allen Fällen angestellt; d. h., wenn wir den Betrag an Kohlendioxyd oder Alkohol bestimmten, der von einem Presssaft aus Zucker erzeugt wurde, so wurde eine entsprechende Menge desselben Presssaftes unter identischen Bedingungen, aber ohne Zusatz von Zucker, geprüft und das entwickelte Gas, sowie der entstandene Alkohol sorgfältig nach denselben Methoden ermittelt, welche wir bei den Versuchen unter Zusatz von Zucker anwendeten. Die zugefügten Antiseptica hatten den Zweck, eine mögliche Einwirkung der Hefezellen oder anderer Mikroorganismen zu verhindern. Die Art des Antisepticums richtete sich nach dem Versuchsobject, doch wurde in allen vergleichenden Experimenten das gleiche Antisepticum und in gleicher Menge genommen. Die hauptsächlich verwendeten Antiseptica waren Natriumarsenit, Toluol und Thymol, alle in dem Verhältniss 1 : 100.

Bei unseren ersten Versuchen wendeten wir 40 pCt. Rohrzucker an, eine Concentration, welche auch Buchner zuerst für die günstigste hielt; später reducirten wir die Zuckermenge auf 10 pCt., da wir fanden, dass bei dieser Concentration die Wirkung eine grössere war. In der That schien der grössere Betrag an Zucker einen verzögernden Einfluss auf die Thätigkeit des Presssaftes auszuüben.

Die erhaltenen Resultate.

In Tabelle II stellen wir die Resultate einiger unserer Versuche zusammen, bei welchen das entwickelte Gas durch Verdrängung von Kochsalz-Lösung gemessen wurde. Das Gasvolumen ist in dieser und den folgenden Tabellen auf 100 ccm Presssaft umgerechnet, obwohl die thatsächlich verwendete Quantität Saft regelmässig entweder 25 ccm oder 40 ccm betrug.

Man bemerkt, dass in nahezu jedem Fall durch die Selbstgährung des Presssaftes mehr Gas erhalten wurde, als wenn die Gährung in Gegenwart von Rohrzucker vor sich ging. Dies trat regelmässig ein bei den Presssäften aus den Hefen der Brauereien A, C und D; in wie weit dieses Ergebniss dem besonderen Charakter der Hefen oder der hohen Zucker-Concentration zuzuschreiben ist, sind wir gegenwärtig noch nicht in der Lage, zu sagen. Ein anderer beachtenswerther Punkt ist der grosse Unterschied in der Wirksamkeit des Presssaftes aus verschiedenen Hefeproben. Wir beobachteten diese Thatsache bei allen unseren Experimenten, aber es ist uns nicht möglich, dieselbe zu irgend einer physikalischen Eigenschaft des Presssaftes, z. B. seiner Dichte, in Beziehung zu bringen. Be-

merkenswerth ist ferner, dass bei weitem der grössere Theil der Einwirkung nach 24 Stunden zu Ende ist; nach dieser Zeit trat entweder überhaupt keine oder nur noch eine geringe Zunahme des entwickelten Kohlendioxyd-Volumens ein. Auch dies gilt für die Mehrzahl unserer Versuche, wie aus den folgenden Tabellen ersichtlich ist.

Tabelle II.

Volumen des von Presssäften aus verschiedenen Hefen entwickelten Kohlendioxyds mit und ohne Zusatz von Rohrzucker.

Herkunft der Hefe	Alter der Hefe nach dem Ein- sammeln	Kohlendioxyd aus 100 ccm Presssaft			
		Nach 24 Stunden		Nach 48 Stunden	
		Für sich ccm	Mit 40 pCt. Zucker ccm	Für sich ccm	Mit 40 pCt. Zucker ccm
A *	Frisch	520	280	600	472
A *	1 Tag	240	808	—	—
A *	2 Tage	133	164	—	—
A *	Frisch	308	186	308	324
A *	Frisch	400	228	400	340
A *	1 Tag	285	270	285	320
A *	1 Tag	162	84	162	150
A **	2 Tage	990	234	990	290
A ***	Frisch	90	170	—	—
A ***	3 Tage	760	560	788	592
A † **	Frisch	900	2165	—	—
A *	5 Tage	280	220	—	—
C *	1 Tag	550	180	—	—
C **	1 Tag	540	100	—	—
C *	3 Tage	160	200	—	—
A *	7 Tage	120	200	—	—
A *	1 Tag	65	90	—	—

- * Toluol
 ** Natriumarsenit } als Antisepticum verwendet.
 † Bei diesem Versuch wurden 10 pCt. Rohrzucker zugesetzt.

Wir untersuchten auch die Wirksamkeit von Säften, welche bei verschiedenen Pressungen gewonnen waren, nachdem, den Anweisungen Buchner's gemäss, nach jeder Pressung dem Presskuchen Wasser zugefügt war. Die Resultate sind in Tabelle III gegeben, aus welcher ersichtlich ist, dass keine bestimmte Beziehung zwischen der Menge des entwickelten Gases und der Art des Pressens besteht.

Tabelle III.

Kohlendioxyd, bei verschiedenen Pressungen nach
24 Stunden entwickelt.

(Die Resultate sind auf 100 ccm Presssaft bezogen; in
allen Fällen wurde Toluol als Antisepticum verwendet.)

Herkunft der Hefe	Alter der Hefe	I. Pressung		II. Pressung		Gemischte Pressung	
		Für sich	Mit 40 pCt. Zucker	Für sich	Mit 40 pCt. Zucker	Für sich	Mit 40 pCt. Zucker
		ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
A	2 Tage	450	280	240	320	—	—
A	Frisch	240	180	60	20	240	110
A	1 Tag	500	205	150	40	210	140
A	6 Tage	200	100	160	80	—	—
C	2 Tage	305	170	320	250	—	—
A	1 Tag	225	145	430	935	—	—
A	1 Tag	240	200	300	352	—	—

Einfluss des Alters der Hefe auf die Wirksamkeit des
Presssaftes.

In der Tabelle IV geben wir einige unserer Resultate in Bezug
auf den Einfluss des Alters der Hefe, d. h. der Zeit, welche zwischen
der Einsammlung der Hefe in der Brauerei und dem Pressen und Zer-
reiben verstrich, auf die Wirksamkeit des erhaltenen Zellplasmas
wieder. Dieselbe Tabelle zeigt auch in gewissem Grade den Einfluss
der Zuckerconcentration auf das Volumen des entwickelten Gases.

Tabelle IV.

Einfluss des Alters der Hefe auf die Wirksamkeit des
Presssaftes.

Her- kunft der Hefe	Alter der Hefe	Entwickeltes Gas pro 100 ccm Presssaft							
		Nach 24 Stunden				Nach 48 Stunden			
		Für sich	5 pCt. Zucker	10 pCt. Zucker	15 pCt. Zucker	Für sich	5 pCt. Zucker	10 pCt. Zucker	15 pCt. Zucker
		g	g	κ	κ	g	g	g	g
A	Frisch	0.215	0.145	—	—	0.615	0.325	—	—
	1 Tag	0.105	0.015	—	—	0.120	0.200	—	—
	2 Tage	0.930	0.445	0.395	0.140	1.205	0.965	0.855	0.570
	3 Tage	1.145	—	0.280	—	1.285	—	0.950	—
B	Frisch	1.480	3.030	3.870	—	1.705	3.550	5.060	—
	1 Tag	1.450	3.140	3.770	3.630	1.770	3.590	4.600	4.050
	2 Tage	1.480	3.540	4.410	3.880	1.480	3.920	5.300	3.970
	3 Tage	—	—	—	—	2.310	2.480	6.600	3.300
	6 Tage	0.83	—	1.370	3.230	0.970	—	1.950	3.720
B	Frisch	0.90	2.800	—	3.720	1.420	2.930	—	4.450
	1 Tag	0.97	2.040	4.040	3.590	1.230	2.930	4.440	4.170
	2 Tage	1.32	2.980	3.390	3.150	2.980	3.290	3.700	3.000

Es ist ersichtlich, dass die Resultate sehr schwankende sind, dass aber bezüglich der Wirksamkeit des Presssaftes die allgemeine Tendenz besteht, dass die Gährkraft bis zu einem gewissen Punkte mit dem Alter der Hefe steigt, wobei das Maximum ungefähr am 3. oder 4. Tage nach dem Einsammeln erreicht wird. Auf die Erreichung des Maximums folgt dann ein sehr schnelles Abnehmen der Wirksamkeit des Presssaftes. Die Schwankungen in dem Betrage der Selbstgärung sind nicht so gross, aber auch hier besteht die Tendenz, derselben Richtung zu folgen. Die Resultate sind aus den Diagrammen der Figg. 2 u. 3 (S. 2779) zu entnehmen, von welchen das Erstere die Selbstgärung und das Letztere die Gärung in Gegenwart von Zucker erläutert und zwar in beiden Fällen sowohl unter Miteinrechnung des bei der Selbstgärung entwickelten Gases, als auch nach Abzug desselben von der Gesamtsumme.

Die Thatsache, dass die Wirksamkeit des Presssaftes mit dem Alter der Hefe bis zu einem gewissen Punkte zunimmt, ist eine Umkehrung dessen, was Buchner und andere Beobachter auf dem Continent bei den untergährigen Hefen festgestellt haben.

Einfluss der Aufbewahrung.

Wird der Presssaft bei oder unterhalb der Temperatur des Gefrierpunktes aufbewahrt, so nimmt der Umfang der Selbstgärung, sowie auch die Zucker-zersetzende Kraft rasch ab. Der Betrag, in welchem dieser Verlust der Wirksamkeit eintritt, ist aus Tabelle V ersichtlich.

Tabelle V.

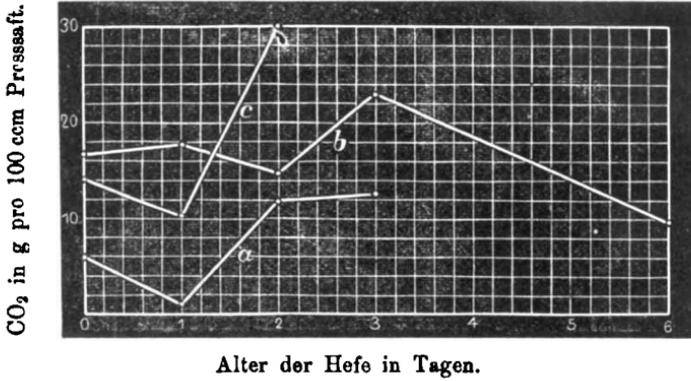
Einfluss des Alters auf die Wirksamkeit des Presssaftes.

Herkunft der Hefe	Alter der Hefe	Entwickeltes Gas pro 100 ccm Presssaft					
		Frisch dargestellt		Nach 24-stündigem Stehen bei -4°		Nach 48-stündigem Stehen bei -4°	
		Für sich	Mit 10pCt. Zucker	Für sich	Mit 10pCt. Zucker	Für sich	Mit 10pCt. Zucker
		g	g	g	g	g	g
B	5 Tage	0.93	1.77	0.49	1.33	0.23	0.29
B	2 Tage	0.63	0.66	0.54	0.63	0.37	0.35

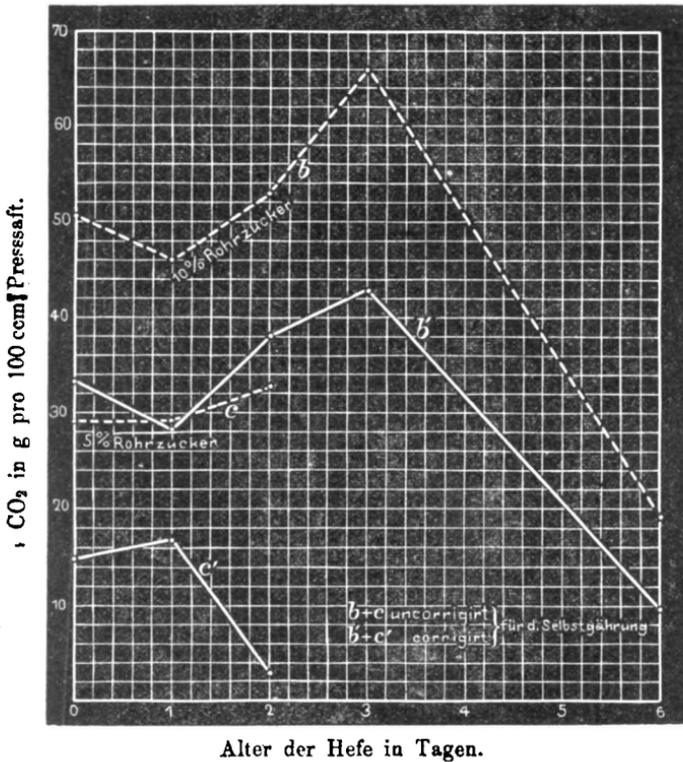
Einfluss der Zuckerconcentration.

Wir haben eine Reihe von Versuchen ausgeführt, um die günstigste Concentration des Zuckers zu bestimmen; die Resultate sind in der folgenden Tabelle VI niedergelegt. Aus derselben ist ersichtlich, dass die kleineren Zuckermengen (5–10 pCt.) die günstigsten Resultate geben, während grössere Quantitäten Zucker die Einwirkung merklich verlangsamen; mit anderen Worten: Aus dem Presssaft + Zucker erhält man weniger Gas, als aus dem Presssaft allein. Dieser Umstand erklärt wahrscheinlich bis zu einem gewissen Grade die Resultate, welche wir bei unseren ersten Versuchen, bei welchen 40 pCt. Zucker verwendet wurden, erhielten (vergl. die Tabellen II und III).

Figur 2.
Einfluss des Alters der Hefe auf die Selbstgärung.
Nach 48 Stunden.



Figur 3.
Einfluss des Alters der Hefe auf die Wirksamkeit des Presssaftes.
Nach 48 Stunden.



Einfluss der Temperatur.

Wir haben verschiedene Versuche angestellt, um die der Wirkung des Presssaftes günstigste Temperatur aufzufinden. Als ein Beispiel der erzielten Resultate diene Folgendes:

Der Presssaft wurde in der üblichen Weise mit 10 pCt. Rohrzucker vermischt. Dann ergaben sich:

bei 0°	0.41 g	Kohlendioxyd	in 48 Stunden
» 10°	0.83 g	»	» 48 »
» 25°	1.05 g	»	» 48 •
» 37°	1.17 g	•	» 48 »

Die höhere Temperatur scheint demnach die Wirksamkeit des Presssaftes zu vergrößern.

Einfluss verschiedener Antiseptica.

Es erschien von Wichtigkeit, den Einfluss verschiedener Antiseptica auf die Wirksamkeit des Presssaftes festzustellen; wir haben deshalb eine Reihe von Bestimmungen ausgeführt, bei welchen wir die verschiedenen antiseptischen Mittel bei der gleichen Probe Presssaft verwendeten. Die gewonnenen Resultate lassen sich aus Tabelle VIII entnehmen.

Tabelle VIII.
Einfluss verschiedener Antiseptica.

Her- kunft der Hefe	Alter der Hefe	Aus 100 cem Presssaft entwickeltes Gas											
		Nach 24 Stunden					Nach 48 Stunden						
		Für sich	Thymol	Natrium- arsenit	Toluol	Formalin	Chloro- form	Für sich	Thymol	Natrium- arsenit	Toluol	Formalin	Chloro- form
g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
* B	2 Tage	0.72	—	0.83	0.63	0.83	0.41	—	—	—	—	—	—
† B	2 Tage	0.50	1.02	—	0.66	0.66	0.97	0.59	1.30	—	—	0.83	1.17
† B	2 Tage	0.95	0.55	0.22	1.19	1.21	0.35	2.12	0.96	0.70	3.00	2.65	1.04
† B	2 Tage	1.36	1.29	1.76	0.72	—	0.56	1.83	1.64	1.84	1.07	—	1.06

* Dieser Versuch wurde ohne Zusatz von Zucker ausgeführt.

† Bei diesen Versuchen waren 10 pCt. Zucker zugesetzt.

Die Antiseptica wurden in dem Verhältniss 1 : 100 zugefügt, mit Ausnahme des Thymols, von welchem eine kleine Menge gepulverter Substanz in das Kölbchen gethan wurde. Als Formalin diente eine Lösung von 1 Th. Formaldehyd in 2000 Th. Wasser, welche im Verhältniss von 1 : 100 angewendet wurde.

Bei dem ersten der mitgetheilten Versuche wurde der Einfluss der Selbstgährung studirt; bei den übrigen drei waren in jedem Fall 10 pCt. Zucker vorhanden. Es ist ersichtlich, dass Natriumarsenit

und Formalin die Wirksamkeit des nicht mit Zucker versetzten Presssaftes in geringem Maasse zu erhöhen scheinen; aber in Gegenwart von Zucker widersprechen die Resultate einander sehr. Die Hefen, aus welchen die Presssäfte gewonnen wurden, waren von verschiedenem Charakter, und auch die Ausbeute an Presssaft war in jedem Falle eine andere. Dies ist wahrscheinlich von grösserem Einfluss auf die Resultate gewesen, als die Natur des einzelnen Antisepticums; indessen sind in dieser Beziehung noch weitere Forschungen nothwendig.

Einfluss der Filtration.

Um festzustellen, ob die Filtration durch Chamberland- und Berkefeld-Filter überhaupt einen Einfluss auf die Wirksamkeit des Presssaftes ausübt, bezw. welcher Art dieser Einfluss ist, wurde eine Reihe von Versuchen mit verschiedenen Presssäften durchgeführt, bei welchen die gasentwickelnde Kraft derselben vor und nach dem Filtriren genau controllirt wurde. Thymol wurde in jedem Fall als Antisepticum verwendet. Die Resultate sind in Tabelle IX niedergelegt, aus welcher ersichtlich ist, dass die Filtration zwar stets in beträchtlichem Maasse sowohl die Selbstgährung, als auch die Einwirkung des Presssaftes auf Zucker herabsetzt, dass sie dieselben jedoch niemals ganz aufhebt. Diese Verminderung der gasentwickelnden Kraft ist von einer sehr beträchtlichen Abnahme des specifischen Gewichts der Presssäfte begleitet. Diese Versuchsergebnisse stimmen mit denen von Buchner in Bezug auf dieselbe Frage überein.

Tabelle IX.

Einfluss der Filtration auf die Wirksamkeit des Presssaftes.

Herkunft der Hefe	Alter der Hefe	Spec. Gewicht		Aus 100 ccm Presssaft entwickeltes Gas			
				Vor dem Filtriren		Nach dem Filtriren	
		vor	nach	Für sich g	Mit 10 pCt. Zucker g	Für sich g	Mit 10 pCt. Zucker g
		dem Filtriren					
* B	3 Tage	—	—	—	0.67	—	0.31
B	2 Tage	—	—	0.43	0.65	0.00	0.10
B	2 Tage	—	—	0.18	1.56	0.25	0.84
* * B	2 Tage	—	—	1.23	0.83	0.11	0.43
B	2 Tage	1055	1018	0.57	0.65	0.24	0.23
B	3 Tage	1045	1030	0.25	1.55	0.24	1.17

* Bei diesem Versuch wurde ein Chamberland-Filter verwendet, bei den übrigen wurden Berkefeld-Filter benutzt.

* * In diesem Falle nach 72 Stunden, in allen übrigen nach 48 Stunden.

Einfluss der Verdünnung.

Für die Aufklärung der Wirkungsart des Presssaftes und des Stoffes, welcher die Gasentwicklung verursacht, erschien es wichtig, den Einfluss der Verdünnung auf die Wirksamkeit des Presssaftes kennen zu lernen. Wie oben erwähnt, wurden alle Versuche in der Weise angestellt, dass die abgewogene Zuckermenge in dem Presssaft selbst gelöst wurde, sodass überhaupt kein Wasser zugefügt wurde. Wenn nun die Wirkung der Presssäfte rein enzymischer Natur war, so sollte eine mässige Verdünnung die Resultate nicht merklich beeinflussen; rührte dagegen die Wirkung der Presssäfte von anderen Ursachen her, so musste sie in grösserem oder kleinerem Maasse von der Verdünnung abhängig sein. Dem zu Folge führten wir eine Reihe von Versuchen durch, bei welchen reines Wasser, physiologische Kochsalzlösung (mit 0.75 pCt. Chlornatrium), ferner Wasser in Gegenwart von Zucker als Verdünnungsmittel dienten. Die Versuche mit Zucker wurden auf zwei Arten angestellt; entweder wurde der Zucker (10 pCt.) in üblicher Weise dem Presssaft zugesetzt und dann Wasser bis zu der gewünschten Verdünnung hinzugefügt (hierbei blieb also das Verhältniss Zucker:Presssaft constant), oder es wurde mit einer 10-proc. Zuckerlösung verdünnt, sodass das Verhältniss des Zuckers zu dem Gesamtvolumen ein constantes blieb. Die gewonnenen Resultate ergeben sich aus Tabelle X. Die Prüfung derselben zeigt sogleich, dass die Selbstgärung sowohl durch Verdünnung mit Wasser, als auch mit Salzlösung stark beeinflusst wird. Während die Zugabe schon des gleichen Volumens Wasser die Wirkung merklich verzögert, hebt die Verdünnung mit dem doppelten Volumen Wasser die Gasentwicklung praktisch auf. Bei Verwendung einer Salzlösung zeigt sich diese Wirkung noch deutlicher.

Bei der Gegenwart von Zucker ist die verzögernde Wirkung ebenfalls gut wahrzunehmen, speciell wenn die Concentration des Zuckers mit der Verdünnung abnimmt. In letzterem Falle ist der Einfluss der Verdünnung ebenso deutlich erkennbar wie bei der Anwendung von reinem Wasser oder Salzlösung. Wird die Stärke der Zuckerlösung constant erhalten, so ist die Verzögerung ebenfalls beträchtlich, jedoch nicht so gross wie in den anderen Fällen.

Der paralyisirende Einfluss der Verdünnung auf die Wirksamkeit des Presssaftes steht mit dem allgemeinen Verhalten der Enzyme unter ähnlichen Bedingungen in so grossem Widerspruch, dass derselbe unserer Meinung nach einen schwerwiegenden Einwand gegen die Annahme der Buchner'schen Enzym-Theorie bedeutet. Nachdem die obigen Versuche bereits abgeschlossen waren, wurde uns bekannt, dass auch Wróblewski Verdünnungsversuche mit dem gleichen Resultat ausgeführt hat.

Tabelle X.

Einfluss der Verdünnung auf die Wirksamkeit des Presssaftes.

Her- kunft der Hefe	Alter der Hefe	Gas aus 100 cem Presssaft							
		Nach 24 Stunden				Nach 48 Stunden			
		Für sich	ver- dünnt 1:1	ver- dünnt 1:2	ver- dünnt 1:3	Für sich	ver- dünnt 1:1	ver- dünnt 1:2	ver- dünnt 1:3
K	K	K	K	K	K	K	K		
a) mit reinem Wasser									
A	1 Tag	1.49	1.25	0.02	0.00	1.71	1.32	0.05	0.00
B	5 Tage	0.83	—	0.54	—	0.97	—	0.58	—
B	5 Tage	1.05	—	0.00	—	1.37	—	0.09	—
B	6 Tage	1.22	0.99	0.31	0.07	—	—	—	—
b) mit 0.75-procentiger Kochsalzlösung									
A	Frisch	0.90	0.05	0.00	0.00	—	—	—	—
B	5 Tage	0.83	—	0.10	—	0.97	—	0.17	—
B	5 Tage	1.05	—	0.00	—	1.37	—	0.08	—
c) mit Wasser, bei Gegenwart von 10 pCt. Rohrzucker im Presssaft									
B	6 Tage	1.30	0.10	0.10	0.05	1.30	0.10	0.10	0.05
B	6 Tage	1.66	0.23	0.10	0.08	—	—	—	—
d) mit Wasser, bei Gegenwart von 10 pCt. Rohrzucker im Gesamtvolumen.									
B	5 Tage	1.77	0.67	0.47	0.55	—	—	—	—

In Verbindung mit der Frage nach dem Einfluss der Verdünnung auf die Enzym-Wirkung mag erwähnt werden, dass, als eine 6 Tage alte Presssaftprobe mit Rohrzuckerlösung auf 1:1000 verdünnt wurde, 50.5 pCt. des Rohrzuckers invertirt wurden, während ein anderer, 3 Tage alter Presssaft bei einer Verdünnung von 1:100 eine Inversion von 79.5 pCt. des vorhandenen Rohrzuckers ergab. Dies bildet einen scharfen Gegensatz zu dem Einfluss der Verdünnung des Presssaftes auf die Production von Kohlendioxyd.

Verhältniss von Kohlendioxyd zu Alkohol.

Bezüglich der Frage, ob man es hier mit einer wirklichen alkoholischen Gärung zu thun hätte, war es wichtig festzustellen, ob Alkohol und Kohlendioxyd in denselben Mengen wie bei der gewöhnlichen alkoholischen Gärung producirt wurden, und ob der Betrag an Zucker, der während des Versuchs verschwand, in irgend einer Beziehung zu dem gefundenen Alkohol und Kohlendioxyd stand. Wir stellten behufs Aufklärung dieser Punkte eine grosse Reihe von Versuchen an; die Resultate einiger derselben sind in Tabelle XI aufge-

führt. Bei den Versuchen 1 bis 5 wurden die Alkohol- und Kohlendioxyd-Bestimmungen mit derselben Substanzprobe ausgeführt; bei den Versuchen 6 bis 15 wurden jedoch für die beiden Bestimmungen zwei verschiedene Gährproben — unter gleichen Bedingungen und mit demselben Presssaft — angesetzt. Wir thaten Letzteres, um bei den Alkoholbestimmungen eine grössere Genauigkeit zu erzielen; das entweichende Gas konnte hierbei mit etwas Wasser gewaschen werden, welches nach und nach in das Destillirkölbchen gegeben wurde. Wenn beide Producte bei einem Versuch neben einander bestimmt werden sollten, war Letzteres nicht angängig.

Es ist aus der Tabelle ersichtlich, dass der aus der Presse kommende Saft immer beträchtliche Mengen Alkohol enthält; wir fanden bei speciellen Versuchen, dass diese Mengen genau mit der Quantität Alkohol übereinstimmen, welche in der Hefe noch enthalten ist, nachdem dieselbe, wie oben beschrieben, gründlich gewaschen und ausgepresst wurde.

Werden Correcturen für die während der Selbstgährung des Presssaftes erzeugten Mengen Alkohol und Kohlendioxyd angebracht, so ist das Verhältniss zwischen dem übrig bleibenden Alkohol und Kohlendioxyd sehr verschieden und entspricht nur in den Fällen, bei welchen ein besonders wirksamer Presssaft verwendet wurde, annähernd dem von Pasteur gefundenen¹⁾. Bei schwächeren Presssäften scheint gar kein oder nur ein geringer Zusammenhang zwischen den Mengen beider zu bestehen, wenn auch die Regel gilt, dass die Quantität des Alkohols grösser ist, als diejenige des Kohlendioxyds.

Man könnte glauben, dass die von uns ermittelten Mengen Alkohol durch eine Ungenauigkeit der Methode zur Bestimmung der beiden Producte gefunden wurden; das folgende Beispiel einer derartigen, doppelt ausgeführten Bestimmung zeigt jedoch, dass unser Verfahren einer recht beträchtlichen Genauigkeit fähig ist.

Entwickeltes Kohlendioxyd	0.327 g	0.337 g
Entstandener Alkohol	0.95 »	0.95 »
Vergohrener Zucker	1.167 »	1.158 »

Bei allen, oben mitgetheilten Versuchen tritt eine sehr bemerkenswerthe Thatsache zu Tage, nämlich die, dass die Menge an Zucker, welche verschwindet, weit grösser ist, als diejenige, welche — nach den für Alkohol oder Kohlendioxyd gefundenen Zahlen — thatsächlich vergohren wird. Je genauer jedoch das Verhältniss zwischen den beiden Producten sich dem theoretischen anschliesst, um so geringer ist der Ueberschuss an verschwindendem Zucker.

¹⁾ Rohrzucker liefert 51.11 pCt. Alkohol und 49.42 pCt. Kohlendioxyd.
Dextrose » 48.55 » » » 46.95 » »

Tabelle XI.
Verhältniss von Kohlendioxyd zu Alkohol.

No. des Versuchs	Alter der Hefe	Ursprünglich in der Hefe vorhandener Alkohol	Selbstgärung			Gärung unter Zusatz von 10 pCt. Zucker				
			CO ₂ g	Alkohol g	Zunahme an Alkohol	Ver-gohrener Zucker	Zunahme an CO ₂	Alkohol g	Ver-gohrener Zucker	Zunahme an Alkohol
* 1	1	1.85	1.380	2.90	1.05	5.8385	0.255	4.75	5.8385	1.85
* 2	2	3.90	1.280	7.90	4.00	4.2925	0.000	7.90	4.2925	0.00
* 3	3	3.25	0.655	3.25	0.00	6.1015	1.375	6.10	6.1015	2.85
* 4	4	4.20	1.890	5.95	1.75	—	0.565	6.55	4.6150	0.60
* 5	6	4.20	0.950	3.15	—	1.7200	0.210	3.40	—	0.25
* 6	3	3.70	1.110	4.30	0.60	2.5250	0.110	5.25	2.8125	0.95
* 7	5	3.95	1.205	4.80	0.85	2.1815	0.010	5.25	2.8300	0.45
** 8	7	3.80	0.641	3.80	0.00	4.1150	0.447	4.25	1.7585	0.65
** 9	7	4.45	0.510	5.05	0.60	7.4130	0.652	5.70	4.3900	0.65
** 10	3	4.12	1.493	4.52	0.40	3.0705	0.012	4.85	2.1075	0.32
** 11	5	2.90	0.403	3.00	0.10	1.1535	0.192	2.75	1.0857	0.00
* 12	2	2.80	0.731	3.75	0.95	1.3405	0.184	3.90	4.1500	0.15
* 13	1	2.12	0.234	1.75	0.63	0.0000	0.000	1.85	0.0000	0.10
* 14	3	3.15	0.373	3.12	0.00	5.0415	1.902	5.55	6.4135	2.43
* 15	3	4.17	0.560	4.25	0.08	8.3315	3.100	7.50	9.0800	3.25

** Zu diesen Versuchen wurde Dextrose verwendet.

» » Rohrzucker »

Als Antisepticum diente Thymol.

Wir wurden hierdurch auf den Gedanken gebracht, dass es irgend ein Bestandtheil des Presssaftes sein möchte, welcher eine correcte Bestimmung des Zuckers verhinderte; bei hierauf bezüglichen Versuchen fanden wir indess, dass, wenn man dem Presssaft Zucker hinzufügt und dann die Wirksamkeit des Saftes durch Erhitzen zerstört, bevor Gährung eintreten konnte, nach der Pavy'schen Methode der volle Betrag an zugesetztem Zucker wiedergefunden wird.

Wir unterwarfen auch das nach der Gährung hinterbleibende Product der Spaltung mit sehr verdünnter Säure, in der Absicht, irgend welche hydrolysirbare Verbindung, die aus den Bestandtheilen des Presssaftes und dem verschwundenen Betrage an Zucker hätte entstehen können, wieder zu spalten, erhielten jedoch kein Resultat: Die reducirende Kraft vor und nach der Behandlung mit Säure bleibt die gleiche. Der Zucker ist deshalb anscheinend als solcher verschwunden und nicht lediglich durch die gewöhnlichen Reagentien unnachweisbar geworden.

Vorläufig müssen wir uns darauf beschränken, diese sehr interessante Thatsache festzustellen; bei dem gegenwärtigen Stand der Versuche scheint es uns noch zu früh zu sein, irgend welche theoretischen Folgerungen aus derselben zu ziehen. Nur der folgenden Vermuthung behufs dieses merkwürdigen Verschwindens möchten wir Raum geben: Während des Lebens der Hefe wird Zucker vom Organismus derselben aufgenommen und zu Kohlendioxyd und Alkohol umgesetzt. Im Speciellen vollzieht sich dieser Process wahrscheinlich in 2 Stufen: 1. findet ein Aufbauen und Incorporiren der Zuckermoleküle durch die lebensbätige Hefe statt (Anabolismus), und 2. tritt ein Auseinanderfallen dieses complicirten Materials in einfachere Producte ein, von denen Kohlendioxyd und Alkohol die regelmässigen und wesentlichen Bestandtheile sind (Katabolismus). Könnte es nicht sein, dass nach dem Auspressen des Zellsaftes die gleiche Reihe von Vorgängen sich abspielt, wenigstens in dem Zeitraum, in welchem der leicht veränderliche und instabile Zellsaft in einem Zustand verharret, welcher annähernd mit demjenigen identisch ist, in welchem er sich in der lebenden Zelle befand? Erscheint diese Hypothese annehmbar, so liesse sich die wechselnde Wirksamkeit des Presssaftes wenigstens theilweise wie folgt erklären: Es sei X ein hypothetischer Protoplasma-Bestandtheil der Zelle, der sich mit dem Zucker zu verbinden vermag. Die Processe, welche sich in dem ausgepressten Zellsaft — in welchem X noch vorhanden ist — abspielen, könnten dann vielleicht die folgenden sein:

- a) Bei der Selbst-Gährung, nach dem Auspressen des Saftes, zer-
setzt sich continuirlich die während des Lebens der Zelle ent-

standene Zucker-X-Verbindung und liefert Kohlendioxyd und Alkohol.

- b) Bei dem Verschwinden des Zuckers schreitet die Bildung der Zucker-X-Verbindung bis zu einem gewissen Punkte vor, der abhängig von der Wirksamkeit des Presssaftes ist, aber die Zersetzung dieser Verbindung erreicht ihr Ende, bevor die ganze Zuckermenge in Form von Kohlendioxyd und Alkohol in Freiheit gesetzt wurde. Bei einem sehr wirksamen Presssaft kann man sich nun vorstellen, dass dieser Process sich so lange vollzieht, bis praktisch die sämtliche Zucker-X-Verbindung zerlegt worden ist. Bei einem schwachen Presssaft findet der Aufbau-Process schneller, als der Abbau-Process statt, und dem zu Folge bleibt, wenn die Thätigkeit von X aufhört, ein Ueberschuss an Zucker in Gestalt der Zucker-X-Verbindung in der Lösung.

Wir setzen unsere Versuche mit dem Hefezell-Plasma fort und hoffen, unsere weiteren Resultate der Gesellschaft zur gegebenen Zeit mittheilen zu können. Inzwischen ist es vielleicht angebracht, die bisher von uns gewonnenen Resultate kurz zusammenzufassen. Dieselben scheinen uns bisher nicht zu einer Erklärung des Processes auf Grund der Enzym-Theorie zu führen, sondern eher zu einer solchen, welche sich auf das Phänomen der Lebensthätigkeit des Hefezell-Protoplasmas stützt.

1. Die obergährige Hefe der englischen Brauereien liefert bei geeigneter Behandlung einen Zellsaft, der die vorübergehende Fähigkeit besitzt, Zucker in Alkohol und Kohlensäure zu zerlegen.
2. Der Betrag an von einem wirksamen Presssaft entwickelten Gas ist ebenso gross oder grösser, als der von Buchner ermittelte.
3. Der Zellsaft, wie er von uns erhalten wurde, erleidet eine sehr beträchtliche Selbst-Gährung; die Letztere übertrifft in einigen Fällen diejenige, welche eine Mischung desselben Presssaftes mit Rohrzucker aufweist.
4. Eine mässige Verdünnung (1 : 2) mit Wasser oder physiologischer Kochsalz-Lösung hebt praktisch die gesammte Gährthätigkeit des Presssaftes auf.
5. Nur bei einem sehr wirksamen Presssaft ist das Verhältniss von entstandenem Alkohol zum Kohlendioxyd annähernd dasselbe wie bei der gewöhnlichen alkoholischen Gährung.

6. Lässt man den Zellsaft auf Zucker — Rohrzucker oder Dextrose — einwirken, so ist die verschwindende Zuckermenge erheblich grösser, als diejenige, welche zur Production von Kohlendioxyd und Alkohol verbraucht werden könnte.

The Jenner Institute of Preventive Medicine,
London, Juni 1900.

451. Emil Fischer: Berichtigung.

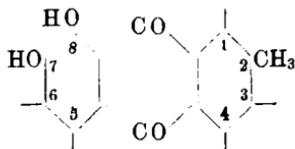
(Eingegangen am 4. August.)

Der von mir kürzlich als neu beschriebene *p*-Oxydiphenylharnstoff (diese Berichte 33, 1701) ist bereits auf etwas anderem Wege von Auwers, Traun und Welde (diese Berichte 32, 3308) dargestellt worden.

Das Versehen rührt daher, dass meine Arbeit vor der Publication von Auwers Ende November 1899 bereits abgeschlossen war, und dass bei der durch äussere Umstände verzögerten ersten Veröffentlichung, welche am 1. März d. J. in der Berliner Academie erfolgte, das Register der Berichte noch nicht erschienen war. Ohne dieses ist es aber kaum möglich, eine solche einzelne und unwichtige Verbindung in der Literatur zu finden.

Berichtigungen.

Jahrg. 33, Heft 10, S. 1630, Z. 23 v. o. muss Formel I lauten:



Jahrg. 33, Heft 14, S. 2267, Z. 5 v. o. lies: »H 11.48« statt »H 10.48«.