

nach den bisherigen Verfahren aus dem Isopren gewonnenen kautschukähnlichen Produkte, im Gegensatz zum Natur-Kautschuk, Gemische von Polymeren des 1.5-Dimethyl-cyclooctadiens-(1.5) und 1.6-Dimethyl-cyclooctadiens-(1.5) sind.

126. Eduard Buchner und Siegfried Skraup: Ist die Enzym-Theorie der Gärung einzuschränken?

[Aus dem Chemischen Institut der Universität zu Würzburg.]

(Eingegangen am 24. Februar 1914; vorgetragen in der Sitzung vom 23. Februar 1914 von Hrn. E. Buchner.)

Die vitale Theorie der Gärung, welche diesen Vorgang als eine direkte Lebensäußerung der Hefezellen auffaßt, mußte verlassen werden, nachdem es gelungen war, mit zellfreiem Preßsft und verschiedenen sterilen Präparaten aus Hefe Zucker in normaler Weise zu zerlegen; an ihre Stelle trat die Enzym-Theorie. Neuestens hat nun Max Rubner¹⁾ die Ansicht ausgesprochen, daß es sich bei der Gärung um 2 verschiedene Vorgänge neben einander, um einen vitalen und einen enzymatischen Zerfall des Zuckers handelt; der ganz überwältigende Anteil soll auf Zellwirkung beruhen²⁾. Dabei wird jedoch kein Unterschied im chemischen Verlaufe der beiden Prozesse angenommen.

Sollte Hrn. Rubners Ansicht zutreffen, so hätte man aus im ganzen richtigen Beobachtungen nur viel zu weit gehende Schlüsse gezogen, wie es sich in der Wissenschaft in ähnlichen Fällen schon oft ereignet hat. Wird aber die Beweisführung Rubners einer genaueren Prüfung unterzogen, zeigt sich, daß sie keineswegs als überzeugend erachtet werden kann. Es sei jedoch ausdrücklich bemerkt, daß sich unsere Einwände nicht auf die vielseitigen ernährungsphysiologischen Ergebnisse Rubners, sondern nur auf die gärungschemischen Fragen beziehen.

I. Hrn. Rubners sogenannte Beweise.

Zwei Versuche sollen angeblich das Problem in eindeutigster Weise entscheiden³⁾. Zunächst wird die Einwirkung von Kochsalz

¹⁾ Die Ernährungsphysiologie der Hefezelle bei alkoholischer Gärung, Rubners Archiv f. Physiol., Suppl.-Bd. 1913, 1—369; auch als Monographie erschienen.

²⁾ Unter günstigen biologischen Bedingungen 95—98%.

³⁾ a. a. O. 55.

auf gärende Hefe beschrieben. »Bei 2—4% Kochsalz ergaben sich keine merklichen Unterschiede; erst da, wo im mikroskopischen Bild Veränderungen sichtbarer Natur eintreten, ist auch das Gärvermögen vermindert und war bei 12% Kochsalz so gut wie aufgehoben«. Der zweite Versuch betrifft die Einwirkung von Gerbsäure auf die normale und die zellfreie Zuckergärung. Die lebende Hefe wird in ihrer Tätigkeit auch von erheblichen Mengen jenes Stoffes nicht gehemmt. Setzt man aber zu zerriebener Hefe Gerbsäure in derselben Konzentration, so entsteht eine mächtige Fällung des Plasmas; gleichzeitig unterbleibt die Gärwirkung. Hr. Rubner folgert: »Das Verhalten plasmolysierter Zellen und solcher mit zerstörter Struktur gibt einen sicheren Beweis, daß die Gärung eine Lebenserscheinung und kein rein fermentativer Vorgang ist«.

Diese Befunde verlieren nun alles Überraschende, wenn man berücksichtigt, daß es sich bei der Hefe um lebende Zellen handelt, bei denen Ein- und Austritt von Stoffen durch die Zellmembran und die Plasmahaut geregelt werden, und daß der Gärungsvorgang sich nur im Innern der Zellen abspielt¹⁾. Wenden wir uns zunächst zum zweiten Versuch. Nach E. Overton²⁾ treten nur ätherlösliche Stoffe leicht in das Zellinnere und außerdem Nahrungsstoffe. Die Gerbsäure gehört weder zur einen, noch zur andren Gruppe. Da aber auch die Zymase aus der Zelle nicht austritt, ist eine schädliche Einwirkung der Gerbsäure ausgeschlossen; nur bei Zertrümmerung der Zellen kann sie auf deren Inhalt einwirken. Ähnlich auffällig, wenigstens im ersten Augenblick, ist das Verhalten der lebenden Hefe und des Hefepreßsaftes gegenüber Glykogen-Lösungen, wie schon früher gezeigt wurde³⁾; nur mit dem Preßsaft tritt Gärung ein, offenbar weil das Glykogen von den Zellen nicht aufgenommen wird.

Als Beweis für die Richtigkeit dieser Anschauungen mögen ferner unten beschriebene Versuche dienen (s. u. Tabelle I), welche das Verhalten von lebender Hefe und von Acetonfällung aus Hefepreßsaft

¹⁾ B. 31, 214 [1898]; E. und H. Buchner und M. Hahn, »die Zymasegärung«, Monographie, München 1903, 49; Buchner und Antoni, H. 46, 153 [1905].

²⁾ Pflügers Archiv f. Physiologie 92, 258 [1902]. Die Ausführungen von Overton beziehen sich zunächst auf die Muskelfasern, doch wird ausdrücklich hervorgehoben, daß sich andre tierische und pflanzliche Zellen bezüglich der Durchlässigkeit genau ebenso verhalten, a. a. O. 258. — Ähnliche Erwägungen sind bei Studien über das Eindringen von Giftstoffen in lebende Zellen durch Hans Horst Meyer angestellt worden.

³⁾ Buchner, B. 31, 214, 1091 [1898]; Monographie »die Zymasegärung« 1903, 49, 101.

bei Toluolzusatz gegenüber 60-prozentiger Zuckerlösung gewichtsanalytisch klarlegen¹⁾; Gärung ist nur im letzteren Falle zu beobachten, da im ersteren der Zucker nicht in die Zellen gelangt. Eine Vernichtung der Gärungsenzyme im Innern der Zellen liegt aber keineswegs vor; dies beweist die bei Anwendung größerer Hefemengen deutliche »Selbstgärung«, bei welcher das Glykogen in den Zellen abgebaut und vergoren wird (Tab. I, Nr. 9).

Zur Erklärung der normalen Aufnahme von Zucker in die lebenden Hefezellen, welcher nicht ätherlöslich ist und daher von vornherein zu den schwerst eindringenden Verbindungen gehört, stellt E. Overton vorläufig zwei Hypothesen auf. Entweder wird der Zucker in Gestalt irgend eines ätherlöslichen Zuckerderivates, eines Esters, Äthers oder Anhydrids aufgenommen; so dringt z. B. der Triessigsäureester des Glycerins, das Triacetin, im Gegensatz zum Glycerin selbst sehr schnell in die verschiedensten Pflanzen- und Tierzellen ein²⁾. Oder, was Overton für wahrscheinlicher erachtet³⁾, die Zuckeraufnahme erfolgt infolge einer chemischen Reaktion zwischen Zucker und einem Bestandteil der Protoplasma-Grenzschichten, also unter Bildung einer Verbindung, die im Zellinnern wieder gespalten wird⁴⁾. Diese aktive Beteiligung der Plasmahaut ist es wahrscheinlich, welche durch die wasserentziehende Wirkung stark konzentrierter Zuckerlösungen gestört wird.

Der andre Versuch von Hrn. Rubner, betreffend die Einwirkung von Kochsalz auf gärende Hefe, konnte bei der Nachprüfung (Tab. II) insofern bestätigt werden, daß ein Zusatz von 12% Natriumchlorid die Gärung durch lebende Hefe verhindert, was zu erwarten war. Aber entgegen den Angaben Rubners drückt schon 4% Salzzusatz die Gärung um etwa 38% herab; es ist dadurch die als auffällig betonte sprunghafte Änderung der Einwirkung steigender Salzzusätze widerlegt. Beim Eintragen von Hefe in 12-prozentige Kochsalzlösung (bei gleichzeitiger Anwesenheit von 20% Rohrzucker) verliert sie, wie wir direkt durch Abschleudern der Flüssigkeit nachweisen konnten, 14—20% Wasser; durch diese Plasmolyse wird nun der Eintritt des Zuckers in das Zellinnere verhindert; die Gärung unterbleibt. Setzt man nämlich nach eintägigem Stehen der Hefe mit Zuckerlösung und 12% Kochsalz durch Zusatz einer großen Menge Zuckerlösung den Kochsalzgehalt auf 4% herunter, so beginnt langsam, aber stetig fortschreitend der Gärungsvorgang und erreicht bezw. überschreitet nach längerer Zeit sogar die Höhe, wie

¹⁾ Qualitative Untersuchungen darüber liegen bereits von Hans Buchner vor, Münch. medicin. Wochenschrift 1897, 1244; »Zymasegärung« 1903, 173.

²⁾ Pflügers Archiv f. Physiol. 92, 228 [1902].

³⁾ Gütige Privatmitteilung.

⁴⁾ Vgl. Hrn. Rubners Ausführungen über Adsorption von Zucker durch Hefezellen, a. a. O. 268, 269.

sie für 4% Kochsalzzusatz charakteristisch ist. Da an eine so weit gehende Neubildung von Gärungsenzymen in der stickstofffreien Lösung nicht gedacht werden kann, war also die Zymase einfach erhalten geblieben; die Erscheinung ist wieder dadurch zu erklären, daß 12-prozentiger Kochsalzzusatz den Zuckereintritt in das Zellinnere unterbindet¹⁾.

Gelegentlich erwähnt auch Hr. Rubner²⁾ die Bedeutung der Zellmembran und der Plasmahaut: er schreibt selbst, daß der Austausch von Stoffen durch die Zellwand den einfachen osmotischen Auffassungen nicht zu entsprechen scheine, daß vielmehr besondere Eigenschaften der Zellwand gerade bezüglich der Nahrungsstoffe deren Aufnahme regeln. Bei den beschriebenen Versuchen finden aber derartige Erwägungen keine Beachtung.

II. Methodik, um die Gärwirkung zu bestimmen.

Während bei allen früheren Versuchen des einen von uns die Gärwirkung durch Wägen oder seltener durch Messen des Kohlendioxyds verfolgt wurde, verwendet Hr. Rubner die Gärwärme als Maßstab, welche »auf mikrocalorimetrischem Wege« in Weinhold- oder Dewar-Kölbchen und in Thermostaten direkt an Thermometern abgelesen wird³⁾. Diese neue Methode mag manchmal Vorteile bieten. Sie erfordert aber etwas zeitraubende Vorarbeiten in der Eichung der Instrumente und eine gewisse Übung⁴⁾; sie besitzt ferner, wie alle Mikromethoden, auch ungünstige Seiten. Z. B. veranlaßt sie Hrn. Rubner, zur Trennung der Gärwirkung von den Lebensvorgängen von dem bewährten Verfahren der Herstellung steriler Dauerhefe durch Eintragen der Hefe in Aceton, abzugehen und sich mit einfacher Aufhebung der Lebensvorgänge durch Zusatz von Toluol zu begnügen, weil so »durch Schonung der Zellen eine allzu stürmische Wärmebildung verhindert wird«⁵⁾, der offenbar die Apparatur nicht gewachsen ist. Die Folgen dieses Verfahrens für die Gärwirkung sind im nächsten Abschnitt erörtert.

Hr. Rubner arbeitet ferner bei 30 und sogar 38°, obwohl der eine von uns als günstigste Temperatur 22° angegeben hat, vielleicht weil die Mikrocalorimetrie bei höherer Temperatur besser funktioniert, und sieht sich daher genötigt, »eine bei höheren Temperaturen gut fortkommende Hefe«⁶⁾, d. h. Oberhefe, zu benutzen, trotzdem sich Oberhefe zum Nachweis der Zymasewirkung wenig eignet⁷⁾.

¹⁾ Ein weiterer Grund für das Aufhören der Gärung dürfte in dem Verhalten des Ko-enzym unter diesen Umständen gegeben sein; siehe im experimentellen Teil.

²⁾ a. a. O. 92, 269.

³⁾ a. a. O. 26.

⁴⁾ a. a. O. 26, 28, 33.

⁵⁾ a. a. O. 60, 57.

⁶⁾ a. a. O. 53.

⁷⁾ Buchner, B. 30, 1111, 2676 [1897]: »Zymasegärung« 1903, 57.

Die mikrocalorimetrische Methode führt unter Umständen auch zu direkt unverständlichen Ergebnissen; so zieht Hr. Rubner¹⁾ aus Versuchen den Schluß, daß zwischen der Summe der Fermentwirkung von 2—10 g Toluolhefe auf dieselbe Menge 20-prozentiger Zuckerlösung »ein nachweisbarer Unterschied gar nicht vorhanden« ist. Eine Erklärung wird nicht gegeben; da aber die Enzymmenge von 2 und von 10 g Toluolhefe unmöglich gleich sein kann, muß, wenn man nicht Irrtümer beim Ablesen der Temperaturen annehmen will, die Methode versagt haben. Fehler können z. B. dadurch entstanden sein, daß die Wärmetönungen nicht berücksichtigt werden, welche mit dem Gelöstbleiben bezw. der Abgabe von Kohlendioxyd verbunden sind und nach einer annähernden Berechnung etwa 10% der entwickelten Gesamtwärme betragen können: geringe Wärmeverluste treten ferner durch Entweichen von Wasserdampf²⁾ mit dem Kohlensäuregas ein; störend kann auch die verschiedene Konzentration der aus den wechselnden Mengen von Toluolhefe bei gleichbleibendem Volumen der Zuckerlösung heraustretenden Enzyme wirken, welche das Gärungsagens schädigen: der Lipase und der Endotryptase.

Hr. Rubner äußert sich über die von Buchner meistbenutzte Kohlensäureverlust-Methode absprechend; »weil man behufs Wägen der Apparate diese immer erkalten lassen muß, was den Gärprozeß gewaltig beeinflußt, gibt nicht eine einzige der mit dieser Methodik ausgeführten Reihen ein zuverlässiges Bild«³⁾. Diese Einwände sind unbegründet. Hr. Rubner übersieht, daß es sich hier durchaus um keine »Mikromethode« handelt, deren Ergebnisse durch einen Windhauch umgestoßen werden. Die Wägungen sind nämlich nur auf Zentigramme genau erfolgt. Die Versuche werden ferner bei 22° ausgeführt; ein Erkaltenlassen der Kölbchen ist also unnötig. Wenn während des Abwägens bei Zimmertemperatur (16—20°) der Gasraum der Kölbchen sich wirklich um 4° abkühlt, könnte, da dieser Gasraum 70 ccm beträgt, infolge der Zusammenziehung des Gases nur eine Gewichtszunahme von 1.3 mg erfolgen; übrigens wird auch das verhindert durch den angewandten Schwefelsäure-Gärverschluß nach Meißl samt Bunsen-Ventil⁴⁾. Die Temperatur der Gärflüssigkeit selbst endlich nimmt während der kurzen Zeit der Wägung sicher nicht einmal um 4° ab, so daß eine Beeinflussung des Gärungsverlaufes bei täglich nur einmaliger Wägung nicht zu befürchten steht. Bemerkenswert mag noch werden, daß eine Übersättigung der Flüssigkeit mit Kohlendioxyd durch regelmäßiges kräftiges Umschwenken möglichst vermieden wird.

¹⁾ a. a. O. 77.

²⁾ Rubner (a. a. O. 32) vermeidet die Wasserverdunstung möglichst durch Aufgießen einer Ölschicht.

³⁾ a. a. O. 26.

⁴⁾ »Zymasegärung«, 1903, 82.

III. Angebliche Ermittlung des vitalen Anteils der Zucker-Zersetzung.

Hr. Rubner faßt den kühnen Gedanken, eine direkte Trennung zwischen enzymatischer und vitaler Gärung durchzuführen. Es sollen die ganze Gärwirkung der lebenden Hefe und der fermentative Anteil für sich bestimmt werden; die Differenz zwischen beiden entfällt dann auf die vitale Leistung. Erste Aufgabe wäre da gewesen, zum Töten der Hefe eine Methode ausfindig zu machen, bei welcher alle Enzyme erhalten bleiben. Daß die Herstellung von Preßsaft dafür nicht in Frage kam, liegt klar zutage, denn im Preßrückstand bleibt nachweislich ein erheblicher Teil der Gärwirkung stecken¹⁾; der Wert dieses ältesten Verfahrens liegt natürlich im Nachweis der zellfreien Gärung. Dann kommt die Herstellung von Dauerhefe in Betracht, am besten durch Eintragen der Hefe in Aceton und Nachwaschen mit Äther; aus der gleichen Hefemenge wird so etwa 5—7-mal soviel Gärwirkung erzielt, als bei der Preßsaft-Darstellung²⁾.

Hr. Rubner setzt aber einfach der gärenden Flüssigkeit Toluol zu in der Annahme, daß die so erhaltene »Toluolhefe« noch alle Enzyme unbeschädigt enthält³⁾. Bei Vergleichsversuchen zwischen Dauerhefe und Toluol-Hefe aus demselben Ausgangsmaterial fand Hr. Rubner tatsächlich »keine andre quantitative Wirkung«⁴⁾. Unten beschriebene Versuche (Tabelle III) zeigen, daß dies nicht allgemein zutrifft. Die Aceton-Dauerhefe ergab in drei Fällen eine 2¹/₂—3-fach größere Gärwirkung als die gleichzeitig aus derselben Hefe hergestellte Toluolhefe. Hrns. Rubners Mißerfolge mit dem Acetonverfahren sind entweder auf die Anwendung einer ganz ungeeigneten Hefe (Oberhefe!) oder auf die Benutzung von unreinem Aceton oder auf nicht genaue Einhaltung des Darstellungsverfahrens zurückzuführen⁵⁾.

Die schlechte Wirkung der Toluolhefe kann darauf beruhen, daß durch Toluol entweder die Aufnahmefähigkeit der Zellen für den Zucker gestört wird⁶⁾

¹⁾ Buchner und Klatté, *Bio. Z.* 8, 531 [1908].

²⁾ *B.* 33, 3777 [1900]; 35, 2380 [1902]; »Zymasegärung«, 1903, 254 ff.

³⁾ Dieses Verfahren hat zuerst zum Nachweis der Oxydase der Essigsäurebakterien neben Darstellung des Aceton-Dauerpräparates Anwendung gefunden; Buchner und Gaunt, *A.* 349, 176 [1906].

⁴⁾ a. a. O. 54, 240.

⁵⁾ Nach Hrns. Rubners eigenen Angaben war die Wirkung der Aceton-Dauerhefe (Handelsname: Zymin), die er sich von meinem früheren Mitarbeiter Hrns. Dr. R. Rapp verschaffte, viel stärker, als durch seine Hefesorten nach der Behandlung mit Toluol jemals erzielt werden konnte (a. a. O. 57). Warum wurde dieser Beobachtung nicht nachgegangen?

⁶⁾ In diesem Sinne äußert sich H. Pringsheim, *Biol. Zentrbl.* 33, 504 [1913].

oder die Grenzschichten, welche die verschiedenen Arbeitsstätten im Zellinnern abtrennen, Schaden erleiden, wodurch das regelmäßige Spiel der Enzyme in Unordnung gerät. Für letztere Annahme spricht, daß die Gärwirkung von Toluolhefe durch Ko-enzym- oder Kochsaftzusatz sehr stark erhöht wird (Tab. III), in einem Falle sogar mehr als die von Dauerhefe, und daß nach eigenen Versuchen (Tab. IIIa) 15—20 Stunden mit Toluol und Wasser bei Zimmertemperatur geschüttelte Hefe wesentlich schlechteren Kochsaft liefert und um die Hälfte herabgesetzte Wachstumsfähigkeit zeigt als gleichzeitig im Kontrollversuch nur mit Wasser ebenso behandelte Hefe. Dadurch tritt der leidende Zustand, in welchen die Toluolwirkung die Hefe versetzt, deutlich in Erscheinung. Besonders rasch verfällt auch nach Angaben Rubners¹⁾ Toluolhefe der Autolyse, wenn sie Zucker bei 38° vergärt. In der Toluolhefe üben demnach Lipase und Endotryptase eine unheilvolle Wirkung aus.

Abermals eine gewaltige Steigerung der Wirkung tritt noch auf, wenn man zu Aceton-Dauerhefe »Kochsaft« setzt (Tabelle III). Die Untersuchungen von Harden und Young, welche von Buchner und seinen Mitarbeitern bestätigt und erweitert werden konnten²⁾, haben gezeigt, daß die Zymase zum mindesten aus 2 unentbehrlichen Agenzien besteht: Aus einem nicht diffundierenden, hitze-empfindlichen, durch proteolytische Enzyme zerstörbaren Teil, der eigentlichen Zymase, und aus dem sogenannten Ko-enzym, das leicht diffundiert und ziemlich kochfest ist, aber durch die Lipase der Hefe außerordentlich schnell zerstört wird³⁾.

Die Eigenschaften dieses Ko-enzyms sind für die Darstellung steriler Dauerpräparate besonders ungünstig, da sie seinen Verlust schon während der Darstellung oder später während des Gärungsvorganges begünstigen. Das Ko-enzym ist aber für den Gärakt notwendig. Die Gärwirkung eines Hefepräparates wird ferner durch den Gehalt an Endotryptase⁴⁾ beeinflusst, welche die Zymase im engeren Sinne zerstört⁵⁾. In der Hefe scheint sich eine Art von Schutzstoff gegen die Verdauungswirkung, eine sog. Antiprotease⁶⁾, vorzufinden, welche ebenso wie das Ko-enzym auch noch in aufgekochtem Auszug aus frischer Hefe, in »Kochsaft«, vorhanden ist. Der einzige Weg, die Wirkung der Zymase der Präparate voll auszunutzen, dürfte deshalb darin bestehen, daß man durch Zusatz von »Kochsaft«, immer

¹⁾ a. a. O. 127.

²⁾ H. 46, 136 [1905]; Bio. Z. 8, 520 [1908]; 19, 191 [1909]; 26, 171 [1910]; Bl. [4] 7, I—XXII [1910], conférence.

³⁾ Buchner und Klatte, Bio. Z. 8, 529 [1809]; Buchner und Haehn, ebenda 19, 196 [1909].

⁴⁾ Martin Hahn, B. 31, 200 [1898].

⁵⁾ E. Buchner, B. 30, 1111 [1897].

⁶⁾ Buchner und Haehn, Bio. Z. 26, 171 [1910].

für die Anwesenheit überschüssigen Ko-enzym und genügender Anti-protease Sorge trägt. So läßt sich die Gärwirkung der Dauerhete abermals auf das Dreifache steigern.

Von der Existenz des Ko-enzym und dem Einfluß von Kochsaff hat Hr. Rubner offenbar keine Kenntnis genommen; er steht 1913 noch auf dem Standpunkt der Monographie »die Zymasegärung« aus dem Jahre 1903. Auch die Wirkung der Toluolhefe läßt sich durch Kochsaffzusatz sehr erhöhen; in einem besonders günstigen Falle wurde sogar die Wirkung von Aceton-Dauerhefe + Kochsaff erreicht.

Die so erzielten Gärwirkungen betragen nun 15—16% der gleichzeitig mit noch lebender Hefe erhaltenen Kohlendioxydzahlen (Tabelle III), während nach Rubner der Anteil der Enzymwirkung »stets nur einen ganz kleinen Bruchteil« der gesamten Wärmemenge ausmacht¹⁾

IV. Zymase-Bildung in lebender Hefe.

Wenn auch im vorigen Abschnitt verschiedene Gründe angeführt wurden, welche das Fehlschlagen aller Versuche, zu einwandfreier Scheidung von Zell- und Enzymwirkung zu gelangen, verständlich machen, so ist doch der entscheidendste Punkt noch nicht erwähnt. Er besteht unseres Erachtens darin, daß in der lebenden Hefe höchstwahrscheinlich fortwährend Neubildung der Gärungsenzyme erfolgt. Auch Hr. Rubner faßt die Möglichkeit ins Auge, daß das Alkoholferment beim Abbau der Eiweißkörper der Zelle entstehen könnte, indem es sich gewissermaßen als Seitenkette des lebenden Protoplasmas aus diesem abspaltet²⁾. Er versucht nun die Neubildung von Zymase dadurch zu verhindern, daß jede Stickstoffnahrung ausgeschlossen wird; wenn es sich aber um ein Spaltprodukt handelt, dann ist zu seiner Bildung Stickstoffnahrung nicht notwendig? Hr. Rubner erwähnt ferner selbst, daß gärende Hefe stets etwas Stickstoffverbindungen ausscheidet, auch wenn der Organismus sich im Masseugleichgewicht befindet und bei Gegenwart von Zucker³⁾.

Außerdem kann bei der Gärung durch lebende Hefe doch gewiß Ko-enzym gebildet werden, das jedenfalls viel einfacher gebaut ist wie die eigentliche Zymase, wahrscheinlich keinen Stickstoff enthält und vielleicht einen Zucker-phosphorsäureester vorstellt⁴⁾. Es ist aber

¹⁾ a. a. O. 58. Hr. Rubner findet als Fermentwirkung zufällig einmal auch 16—20% der Leistung lebender Zellen, wenn er die Wirkung seiner lebenden Oberhefe vergleicht mit von Rapp aus untergäriger Hefe dargestellter Aceton-Dauerhefe. Rubner bemerkt mit Recht indessen, daß ein solcher Vergleich unzulässig ist (a. a. O. 57).

²⁾ a. a. O. 51.

³⁾ a. a. O. 127 ff, 277, 318, 345.

⁴⁾ s. u.; ferner Bio. Z. 8, 529 [1908], wo auch die übrige Literatur zitiert ist.

für den Gärungsvorgang notwendig und wird in den sterilen Präparaten außerordentlich rasch zerstört, schneller als die Zymase selbst¹⁾.

Allerdings hat Hr. Rubner die wichtige Frage der Neubildung von Zymase sich selbst vorgelegt und durch einige Versuche zu entscheiden bemüht²⁾.

Mehrere Proben mit je 5 g Unterhefe in 20-prozentiger Traubenzuckerlösung wurden bei 30° dem mikrocalorimetrischen Verfahren unterworfen und bei der ersten sofort, bei den folgenden nach 3, 6, 9 usw. Stunden Toluol zugefügt. Wenn während der Gärung Zymasebildung eingetreten war, so mußte sich bei der zweiten und den folgenden Proben nach Toluolzusatz eine Steigerung der Wärmetönung bemerkbar machen, was aber nicht deutlich hervortrat. Der daraus gezogene Schluß, daß in der gärenden, aber nicht wachsenden Hefe keine Neubildung von Zymase stattfindet, ist, da aus negativen Ergebnissen gezogen, insbesondere bei der komplizierten Natur des Gärungsagens keineswegs bindend. Sollte bei der hohen Versuchstemperatur, die für Unterhefe sehr ungünstig wirkt, z. B. vollständige Zerstörung des Ko-enzym eingetreten sein, wäre auch starke Neubildung der eigentlichen Zymase ohne Wirkung geblieben.

Es liegen übrigens schon ziemlich ausführliche Versuche über Zymasebildung in der Hefe vor³⁾. Untergärrige Bierhefe wurde dabei im Anschluß an das Regenerierungs- oder Auffrischungsverfahren von M. Hayduck⁴⁾ mit Zuckerlösung bei Mangel an Stickstoffnahrung aufgestellt und im Augenblick höchster Schaumbildung auf Preßsaft oder Dauerhefe verarbeitet; sie führten zur Aufstellung des Satzes: Aufgefrischte Hefe ist nicht solche, die viel Zymase vorrätig enthält, sondern solche, welche dieses Enzym rasch zu bilden vermag³⁾. Die aufgefrischte Hefe lieferte nämlich, wenn man sie nachher bei ganz niederer Temperatur lagern ließ, beträchtlich gärkräftigere Dauerpräparate.

Ähnliche Versuche sind unten zusammengestellt (Tabelle IV), bei welchen Hefe in reinen Zuckerlösungen, also vollständig unter den Bedingungen Rubners aufgefrischt und im Augenblick der höchsten Gärung zum Teil in Dauerhefe verwandelt, zum Teil nach dem Waschen und Abpressen 15 Stunden bei 15° gelagert und dann erst in Dauerpräparat übergeführt wurde. Die Gärkraft wies wieder deutliche Schwankungen auf. Sie fiel beträchtlich beim Auffrischen und steigerte sich wieder etwas bei darauffolgendem Lagern. Um aber Aufschluß zu erhalten, ob nur etwa Verschwinden und Neubildung von

¹⁾ Bio. Z. 8, 523 [1908].

²⁾ a. a. O. 239.

³⁾ R. Albert, B. 32, 2372 [1899]; Buchner und Klatte, Bio. Z. 9, 421 [1908]; »Zymasegärung« 1903, 275—286.

⁴⁾ Wochenschr. f. Brau. 1. 697 [1884]. ⁵⁾ »Zymasegärung« 1903, 280.

Ko-enzym vorliegt, wurden nunmehr jedesmal Parallelversuche mit Zusatz von überschüssigem Kochsaft ausgeführt. Jetzt ergab sich einwandfrei, daß beim Auffrischen innerhalb 6 Stunden eine erhebliche Abnahme an Zymase eintritt, die bei darauffolgendem Lagern in eine Zunahme an jenem Enzym, also eine Neubildung, umschlägt. Diese muß auf Kosten des Zellinhaltes erfolgen; es schließt demnach die Abwesenheit von Stickstoffnahrung die Bildung von Zymase nicht aus und noch weniger selbstverständlich die von Ko-enzym. Hrn. Rubners Versuche darüber können nicht als entscheidend angesehen werden; es bleibt vielmehr die Möglichkeit, ja Wahrscheinlichkeit, daß in der lebenden Hefe bei längerer Andauer der Gärung Neubildung der Gärungsenzyme erfolgt.

V. Stützen theoretischer Art für Hrn. Rubners Ansicht.

Einige Ausführungen von Hrn. Rubner sollen noch kurz besprochen werden. »Die Ursache, welche den Zucker spaltet, muß in der Zymase und beim Protoplasma dieselbe sein. Der Unterschied, das Vitale, ist nichts Mystisches, sondern nur darin zu suchen, daß eben bei der lebenden Substanz die Fermentgruppe direkt mit dem lebenden Komplex in Zusammenhang steht. Durch diese Verbindung muß die Kombination von lebender Substanz und Fermentgruppe einerseits die allem Lebenden eigenartige Selbstregulation bekommen, d. h. nach Bedürfnis die Zersetzung zu regeln imstande sein, und andererseits muß dem Lebenden ein Nutzen aus der Zersetzung fließen, darin bestehend, daß Energie dem ganzen lebenden System zufließt, welche nachträglich ihre Transformierung in Wärme findet«¹⁾. Sind nun diese beiden Punkte nicht auch auf andrem Wege zu erklären, fragt sich der Chemiker skeptisch?

Anknüpfend an die von Hrn. Rubner experimentell festgestellte Tatsache, daß lebende Hefe in 5—20-prozentiger Zuckerlösung unter sonst gleichen Bedingungen dieselbe Wärmemenge erzeugt, wird eine »Selbstregulation des Zuckerverbrauchs« durch Hefe vermutet, wodurch diese innerhalb weiter Grenzen eine gleichmäßige Zersetzung »beizubehalten weiß«²⁾. Die interessante Beobachtung ist aber einfach durch Overtons Feststellung zu erklären, daß die Konzentration der Kohlenhydrate innerhalb der Muskelfasern niemals einen recht geringen Wert überschreiten kann, wie hoch auch die Konzentration derselben im umgebenden Medium steigen mag³⁾. Hefezellen verhalten sich ebenso. Ähnlich wird es vielleicht mit andren »Selbstregulationen« stehen.

¹⁾ a. a. O. 51.

²⁾ a. a. O. 102, 112.

³⁾ Pflügers Archiv f. Physiol. 92, 265 [1902].

Was aber die Ausnutzung der Gärungsenergie für das lebende Protoplasma betrifft, so kommt die Temperaturerhöhung in einer Beschleunigung der chemischen Vorgänge auch dem Lebensprozeß zugute. Da ferner der Gärakt sich innerhalb der Zellen, also in nächster Nähe des lebenden Protoplasmas abspielt, können gewisse Zwischenprodukte des Zuckerzerfalles recht wohl für die Ernährung des lebenden Plasmas nützliche Verwendung finden und so der Energieinhalt des Zuckers den Lebensprozessen dienstbar werden. Daß beim Gärungsvorgange die ganze Wärmemenge des Zuckers mikrocalorimetrisch gefunden wird, widerlegt eine solche Annahme nicht. Von 100 g Zucker erscheinen unter normalen Gärungsbedingungen nur etwa 1.3 g wieder als Hefegewichtszunahme; wenn es sich bei der Energiemenge, die dem Plasma zugute kommt, um eine Größe ähnlicher Ordnung handelt, kann sie sich der Beobachtung entzogen haben. Wie verhält es sich ferner bei den Atmungsvorgängen? Dabei sind Oxydasen wirksam, und, ohne daß Teile des Protoplasmas selbst im allgemeinen verbrennen, muß der Vorgang doch auch Energie für das Plasma liefern.

Die unabweisliche Notwendigkeit eines vitalen Anteils an der Gärung, wie Hr. Rubner¹⁾ meint, läßt sich auch aus diesen Betrachtungen nicht folgern. Verschiedene Einwände Hrn. Rubners haben aber erfreuliche Anregung zu Versuchen gegeben. Faßt man deren Ergebnisse schließlich zusammen, so zeigt sich allerdings, daß vorläufig kein Anlaß besteht, die Enzym-Theorie einzuschränken²⁾.

Experimentelles.

Im Folgenden sind die Zahlenergebnisse der Versuche zusammengestellt. Tabelle I gibt das Verhalten von lebender Unterhefe bzw. von Acetonfällung aus Hefepreßsaft gegenüber 60-proz. Rohrzuckerlösung in 3 Versuchsreihen wieder. In die hochkonzentrierte Zuckerlösung (je 30 g Rohrzucker und 20 ccm Wasser), welche auf 37° vorgewärmt war, wurde die Hefe bzw. Preßsaftfällung behufs gleichmäßiger Verteilung bzw. Lösung in vorgewärmten (37°) Porzellanschalen aufs sorgfältigste eingerührt. Zum Beweise der Gärkraft kam ferner jedesmal Hefe und Preßsaftfällung auch mit 29-proz. Rohrzuckerlösung (8 g Saccharose + 20 ccm Wasser) zur Aufstellung. Während in den letzteren Fällen bald starke Kohlendioxid-Entwicklung eintrat, zeigte sich der 60-proz. Zuckerlösung gegenüber nur die Fällung deutlich wirksam, wengleich erheblich schwächer als mit der verdünnteren Zuckerlösung. Die lebende Hefe hatte der starken Zuckerlösung gegenüber versagt; als jedoch

¹⁾ a. a. O. 53.

²⁾ Ausdrücke wie »Gärungsnährstoff« für Zucker und »Kohlenhydratstoffwechsel« für Gärung, die Hr. Rubner gern gebraucht, sind, da sie vorhandene Unterschiede zu verwischen drohen, nicht empfehlenswert.

bei der Versuchsreihe III absichtlich 5 g lebende Hefe verwendet wurden, trat eine schwache Gärwirkung auf, die wahrscheinlich auf Vergärung des Glykogenvorrates in den Zellen zurückzuführen ist.

Die in der letzten Spalte aufgeführte Endzahl gibt die Kohlendioxyd-Entwicklung bei Stillstand des Gärungsvorganges; der Zeitpunkt dafür wechselte zwischen 8 und 13 Tagen. Bei allen Versuchen mit Preßsaftfällung wurde Toluol zugesetzt; die Temperatur betrug, wie immer, 22°. Jeder einzelne Versuch besteht hier, wie in allen folgenden Tabellen, aus zwei gleich beschickten Parallelkölbchen, deren Ergebnisse sich gegenseitig kontrollieren.

Tabelle I.

Lebende Hefe und Preßsaft-Fällung

in 60-proz. bzw. in 29-proz. Zuckerlösung.

Lebende Hefe bzw. Preßsaftfällung + Toluol, angesetzt mit Rohrzuckerlösung von 60% bzw. 29%; 22°.

| Versuchsreihe | Nr. | Datum | Hefeart | Lebende Hefe oder Preßsaftfällung | | Zuckerlösung | Kohlendioxyd in g nach Tagen | | | | |
|---------------|-----|-------------------|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------|--------------|------------------------------|------|------|------|------|
| | | | | | | | g | % | 1 | 2 | 3 |
| I. | 1 | 16. Dezember 1913 | Würzburger Unterhefe | 1 | lebende Hefe . . | 60 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| | | | | | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| | 2 | | | 2.2 | Preßsaftfällung . | 60 | 0.07 | 0.13 | 0.18 | 0.21 | 0.23 |
| | | | | | | 0.08 | 0.14 | 0.18 | 0.22 | 0.24 | |
| II. | 3 | 28. Januar 1914 | Münchener Unterhefe | 1 | lebende Hefe . . | 29 | 0.90 | 1.62 | 1.80 | 1.85 | 1.87 |
| | | | | | | 0.87 | 1.59 | 1.79 | 1.85 | 1.87 | |
| | 4 | | | 2.2 | Preßsaftfällung . | 29 | 0.58 | 0.86 | 0.88 | 0.88 | 0.88 |
| | | | | | | 0.59 | 0.89 | 0.90 | 0.90 | 0.90 | |
| III. | 5 | 13. Januar 1914 | Würzburger Unterhefe | 1 | lebende Hefe . . | 60 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | | | | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| | 6 | | | 2.5 | Preßsaftfällung ¹⁾ | 60 | 0.18 | 0.33 | 0.45 | 0.53 | 0.54 |
| | | | | | | 0.20 | 0.33 | 0.44 | 0.53 | 0.54 | |
| III. | 7 | 13. Januar 1914 | Würzburger Unterhefe | 1 | lebende Hefe . . | 29 | 1.24 | 1.87 | 2.14 | 2.25 | 2.25 |
| | | | | | | 1.19 | 1.81 | 2.08 | 2.16 | 2.16 | |
| | 8 | | | 2.5 | Preßsaftfällung ¹⁾ | 29 | 0.81 | 0.98 | 0.99 | — | 0.99 |
| | | | | | | 0.81 | 0.92 | 0.92 | — | 0.92 | |
| III. | 9 | 13. Januar 1914 | Würzburger Unterhefe | 5 | lebende Hefe . . | 60 | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.04 |
| | | | | | | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | |
| | 10 | | | 2.5 | Preßsaftfällung . | 60 | 0.11 | 0.19 | 0.25 | 0.29 | 0.31 |
| | | | | | | 0.13 | 0.22 | 0.28 | 0.33 | 0.35 | |
| III. | 11 | 13. Januar 1914 | Würzburger Unterhefe | 1 | lebende Hefe . . | 29 | 1.04 | 1.74 | 2.05 | 2.18 | 2.25 |
| | | | | | | 1.07 | 1.78 | 2.10 | 2.22 | 2.30 | |
| III. | 12 | 13. Januar 1914 | Würzburger Unterhefe | 2.5 | Preßsaftfällung . | 29 | 0.60 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.65 |
| | | | | | | 0.59 | 0.63 | 0.63 | 0.63 | 0.63 | |

¹⁾ Diese Preßsaftfällung wurde aus Würzburger Unterhefe hergestellt.

In Tabelle II ist der Einfluß von Natriumchlorid auf die Gärwirkung lebender Hefe in 2 Versuchsreihen zusammengestellt; zwei ganz ähnlich verlaufende weitere brauchen nicht veröffentlicht zu werden. Sämtliche Kölbchen wurden mit 1 g lebender Hefe, 20 ccm Wasser und 5–5.9 g Rohrzucker beschickt. Bei den beiden ersten (Versuch Nr. 1), die als Kontrolle dienten, erfolgte kein weiterer Zusatz, bei den beiden nächsten (Nr. 2) wurde je 1 g und bei Versuch Nr. 3 je 3.5 g Kochsalz zugefügt. Während die Kontrollkölbchen starke Gärwirkung zeigten, so daß, um Zuckermangel vorzubeugen, nach 2 Tagen noch je 5 g Rohrzucker zugesetzt werden mußten, war die Gärwirkung durch 3.7-proz. Kochsalzzusatz um rd. 40% heruntergedrückt und durch 11.9% Kochsalzzusatz vollkommen aufgehoben. Zum Beweise, daß auch im letzteren Falle nicht etwa die Zymase im Zellinnern zerstört worden war, sondern daß es sich um Unterbindung des Zuckerezutritts ins Zellinnere handelt, wurde bei 2 weiteren Kölbchen, nachdem sie, beschickt wie Nr. 3, mit 11.9% NaCl einen Tag gestanden hatten, nunmehr durch Zusatz von 65 g einer 20-proz. Zuckerlösung der Kochsalzgehalt auf 3.7% herabgedrückt. Jetzt trat langsame aber deutliche Kohlendioxyd-Entwicklung ein und erreichte nach 20–30 Tagen eine Endzahl von ansehnlicher Größe; fremde Organismen waren dabei mikroskopisch nicht nachzuweisen; der langsame Anstieg der Gärwirkung ist wahrscheinlich auf Neubildung von Ko-enzym zurückzuführen.

Tabelle II. Lebende Hefe und Natriumchlorid.

Je 1 g Hefe + 20 ccm Rohrzuckerlösung von 20% ohne und mit Zusatz von NaCl: 22°.

| Versuchsreihe | Nr. | Datum | Hefeart | Rohrzucker | | Zusatz von NaCl | | Bemerkungen | Kohlendioxyd in g nach Tagen | | | | | |
|---------------|-----|-------------------|----------------------|-----------------|----|-----------------|------|--|------------------------------|------|------|------|---------|------|
| | | | | g | % | g | % | | 1 | 2 | 3 | 5 | Endzahl | |
| I. | 1 | 4. November 1913 | Würzburger Unterhefe | 5 ¹⁾ | 20 | — | — | (Kontrolle) | 1.44 | 2.22 | 2.31 | 2.34 | 2.34 | |
| | | | | | | | | | 1.38 | 2.17 | 2.23 | 2.24 | 2.24 | |
| | 2 | | | 5.25 | 20 | 1 | 3.7 | — | — | 0.27 | 0.71 | 1.04 | 1.34 | 1.50 |
| | | | | | | | | | | 0.30 | 0.74 | 1.00 | 1.27 | 1.33 |
| 3 | | | | 5.9 | 20 | 3.5 | 11.9 | — | — | — | — | — | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | 5.9 | 20 | 3.5 | 11.9 | Nach 1 Tag Herabsetzung d. Kochsalzgehaltes auf 3.7% ²⁾ | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | |
| | | | | | | | | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| | | | | | | | | | 0.01 | 0.05 | 0.09 | 0.24 | 1.48 | |
| | | | | | | | | | 0.01 | 0.03 | 0.11 | 0.29 | 1.56 | |
| II. | 5 | 10. Dezember 1913 | Münchener Unterhefe | 5 ¹⁾ | 20 | — | — | (Kontrolle) | 1.09 | 1.89 | 2.05 | 2.18 | 2.20 | |
| | | | | | | | | | 1.16 | 1.96 | 2.12 | 2.23 | 2.25 | |
| | 6 | | | 5.25 | 20 | 1 | 3.7 | — | — | 0.33 | 0.70 | 0.94 | 1.22 | 1.34 |
| | | | | | | | | | | 0.23 | 0.56 | 0.80 | 1.07 | 1.26 |
| 7 | | | | 5.9 | 20 | 3.5 | 11.9 | — | — | — | — | — | | |
| | | | | | | | | | 0.00 | — | — | 0.01 | 0.01 | |
| | | | | | | | | | 0.00 | — | — | 0.00 | 0.00 | |
| 8 | | | | 5.9 | 20 | 3.5 | 11.9 | Nach 1 Tag Herabsetzung d. Kochsalzgehaltes auf 3.7% ²⁾ | 0.01 | 0.08 | 0.25 | 0.60 | 1.93 | |
| | | | | | | | | | 0.01 | 0.08 | 0.22 | 0.58 | 1.89 | |

¹⁾ Nach 2 Tagen wurden nochmals 5 g Rohrzucker zugesetzt.

²⁾ Durch Zusatz von 65 g einer 20-prozentigen Rohrzuckerlösung.

Besondere Versuche, die in Tabelle IIa wiedergegeben sind, beweisen, daß frische Hefe, die 2 Tage bei Zimmertemperatur mit 20-proz. Zuckerlösung unter Zusatz von 12% Natriumchlorid gestanden hat, beim Kochen mit Wasser fast unwirksamen Kochsaft liefert, d. h. kein Ko-enzym mehr enthält. Wie die Versuche Nr. 2 und 5 zeigen, lieferte die Hefe ursprünglich wirksamen Kochsaft, enthielt also viel Ko-enzym; dieses war aber bei der Behandlung der Hefe verschwunden und kein neues gebildet worden. Das Unterbleiben der Ko-enzym-Bildung in mit Rohrzucker und 12% Kochsalz stehender Hefe befindet sich in gewisser Übereinstimmung mit den Annahmen über die Natur des Ko-enzym als Zucker-phosphorsäureester, zu dessen Bildung es hier der Hefe vielleicht an Zucker fehlte.

Tabelle IIa.

Änderung des Ko-enzym-Gehaltes

bei Behandlung der Hefe mit Natriumchlorid.

Je 20 ccm Kochsaft aus Hefe sofort bzw. nach zweitägiger Behandlung mit Kochsalz, versetzt mit je 2 g Aceton-Dauerhefe + 8 g Rohrzucker + Toluol; zur Kontrolle ferner dieselbe Dauerhefe in 29-proz. Zuckerlösung + Toluol; 22°.

| Versuchsreihe | Nr. | Datum | Hefeart | Herstellung des Kochsaftes | Kohlendioxyd in g nach Tagen | | | | |
|---------------|-----|-------------------|---------------------|--|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | Endzahl |
| I. | 1 | 10. Dezember 1913 | Münchener Unterhefe | Ohne Kochsaft (Kontrolle) | 0.57 0.62 | 0.80 0.87 | — | 0.90 0.98 | 0.90 0.98 |
| | 2 | | | Aus Hefe vor Behandlung | 0.49 0.49 | 1.40 1.43 | 1.91 1.94 | 2.19 2.23 | 2.31 2.35 |
| | 3 | | | Aus mit Natriumchlorid behandelte Hefe | 0.29 0.29 | 0.72 0.73 | 0.94 0.94 | 1.02 1.03 | 1.04 1.05 |
| II. | 4 | 21. Januar 1914 | Münchener Unterhefe | Ohne Kochsaft (Kontrolle) | 0.49 0.49 | 0.80 0.81 | 0.94 0.93 | 0.96 0.95 | 0.96 0.95 |
| | 5 | | | Aus Hefe vor Behandlung | 0.45 0.48 | 1.03 1.06 | 1.43 1.44 | 1.66 1.67 | 1.85 1.86 |
| | 6 | | | Aus mit Natriumchlorid behandelte Hefe | 0.29 0.29 | 0.60 0.61 | 0.80 0.80 | 0.90 0.90 | 0.95 0.95 |

In Tabelle III werden Vergleichsversuche über die Gärwirkung von Toluolhefe, von Aceton-Dauerhefe und von derselben lebenden Unterhefe in 3 Versuchsreihen wiedergegeben. Die Gärwirkung, welche mit 5 g Toluolhefe bzw. 2 g Dauerhefe (in 29-proz. Rohrzuckerlösung) bzw. 1 g lebender Hefe (in 20—29-proz. Rohrzuckerlösung¹⁾) ermittelt wurde, ist auf je 100 g lebende Hefe umgerechnet, wodurch sich die kleinen Unstimmigkeiten der Parallelversuche als Folgen des großen Umrechnungsfaktors erklären. Mit den sterilen Präparaten wurden zunächst je 2 Versuche ohne Zusatz von Kochsaft und dann 2 mit Zusatz von solchem immer bei Gegenwart von Toluol ausgeführt.

¹⁾ Eigene Versuche zeigten uns, daß es keinen nennenswerten Unterschied herbeiführt, ob die Zuckerlösung hier 20- oder 29-prozentig ist.

Auf den verschiedenen Umfang der Gärwirkung ist vorne schon hingewiesen; es sei hier nur noch bemerkt, daß unter Zusatz von Kochsaft von der Gärwirkung der lebenden Hefe erreicht wurde:

| | | | | |
|--|------------------------|------|------|--------|
| | bei Versuchsreihe | I | II | III |
| | mit Toluolhefe . . . | 8.0 | 15.0 | — % |
| | mit Aceton-Dauerhefe . | 14.6 | 14.7 | 15.9 % |

Tabelle III. Toluol-Hefe und Aceton-Dauerhefe
ohne und mit Kochsaft-Zusatz im Vergleich mit lebender Hefe.
Beide Hefepräparate + Toluol in 29-prozentiger Zuckerlösung ohne und mit Kochsaft, berechnet auf 100 g lebende Hefe. Zum Vergleich 100 g lebende Hefe in 20—29-prozentiger Zuckerlösung; 22°.

| Versuchsreihe | Nr. | Datum | Hefeart | Art des Hefe-Präparates | Zusatz von Kochsaft | Kohlendioxyd in g nach Tagen | | | | |
|------------------|------|-------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|------------------------------|------|------|--------------------|---------|
| | | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | Endzahl |
| I. | 1 | 26. November 1913 | Münchener Unterhefe | Toluolhefe . . . | ohne | 3.6 | 5.0 | 5.4 | — | 5.8 |
| | | | | | ohne | 3.2 | 4.7 | 5.3 | — | 5.6 |
| | | | | Aceton-Dauerhefe | ohne | 6.7 | 11.1 | 12.7 | 13.0 | 13.0 |
| | | | | | ohne | 6.6 | 10.9 | 12.7 | 13.0 | 13.0 |
| | | | | Toluolhefe . . . | mit | 3.6 | 8.0 | 11.4 | — | 19.6 |
| mit | 2.8 | 7.0 | 10.0 | | — | 18.2 | | | | |
| Aceton-Dauerhefe | mit | 8.9 | 18.3 | 24.7 | 28.3 | 34.2 | | | | |
| | mit | 8.9 | 18.3 | 24.8 | 28.7 | 34.4 | | | | |
| lebende Hefe . . | ohne | 146 | 210 | 222 | 233 | 235 | | | | |
| | | | | | | | 142 | 205 | 219 | 232 |
| II. | 6 | 10. Dezember 1913 | Münchener Unterhefe | Toluolhefe . . . | ohne | 3.0 | 4.2 | 4.4 | — | 4.4 |
| | | | | | ohne | 3.2 | 4.8 | 5.2 | — | 5.4 |
| | | | | Aceton-Dauerhefe | ohne | 6.8 | 9.6 | — | 10.8 | 10.8 |
| | | | | | ohne | 7.4 | 10.4 | — | 11.8 | 11.8 |
| | | | | Toluolhefe . . . | mit | 4.8 | 10.6 | 15.8 | — | 33.8 |
| mit | 4.6 | 9.8 | 15.2 | | — | 32.0 | | | | |
| Aceton-Dauerhefe | mit | 14.2 | 23.0 | — | 31.0 | 32.3 | | | | |
| | mit | 14.1 | 22.9 | — | 31.0 | 32.4 | | | | |
| lebende Hefe . . | ohne | 109 | 189 | 205 | — | 218 | | | | |
| | | | | | | | 116 | 196 | 212 | — |
| III. | 11 | 3. Dezember 1913 | Würzburger Unterhefe | Toluolhefe . . . | ohne | 3.2 | 4.0 | 4.4 | — | 4.4 |
| | | | | | ohne | 2.8 | 3.6 | 3.6 | — | 4.0 |
| | | | | Aceton-Dauerhefe | ohne | 6.9 | 10.7 | — | — | 13.0 |
| | | | | | ohne | 6.9 | 10.9 | — | — | 13.2 |
| | | | | Toluolhefe . . . | mit | 9.7 | 17.3 | — | 32.0 ¹⁾ | 39.1 |
| mit | 9.8 | 16.9 | — | | 31.6 ¹⁾ | 38.9 | | | | |
| lebende Hefe . . | ohne | 136 | 211 | 235 | — | 252 | | | | |
| | | | | | | | 125 | 196 | 211 | — |

¹⁾ Wägung nach 5 Tagen.

Die oben geäußerte Ansicht, daß die auffallend große Steigerung der Gärwirkung von Toluolhefe durch Kochsaff auf eine Schädigung des Ko-enzyma durch die Toluolbehandlung der Hefe hinweist, findet eine Stütze in den Versuchen der Tabelle IIIa, nach denen 20 Stunden mit Toluol und Wasser bei Zimmertemperatur geschüttelte Hefe einen weniger wirksamen, d. h. an Ko-enzym ärmeren Kochsaff liefert als ebenso mit reinem Wasser behandelte. Auf vollständig gleiches Verfahren bei der Herstellung dieser Kochsäfte wurde besonders geachtet.

Tabelle IIIa.
Änderung des Ko-enzym-Gehaltes
 bei Behandlung der Hefe mit Toluol.

Je 20 ccm Kochsaff aus Hefe sofort bezw. nach Behandlung mit Toluol, versetzt mit je 2 g Aceton-Dauerhefe + 8 g Rohrzucker + Toluol; zur Kontrolle ferner dieselbe Dauerhefe in 29-proz. Zuckerlösung + Toluol; 22°.

| Versuchsreihe | Nr. | Datum | Hefeart | Herstellung des Kochsaffes | Kohlendioxyd in g nach Tagen | | | | |
|---------------|-----|-------------------|---------------------|--|------------------------------|------|------|------|---------|
| | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | Endzahl |
| I. | 1 | 10. Dezember 1913 | Münchener Unterhefe | Ohne Kochsaff (Kontrolle) | 0.57 | 0.80 | — | 0.90 | 0.90 |
| | | | | 0.62 | 0.87 | — | 0.98 | 0.98 | |
| | 2 | | | Aus Hefe vor Behandlung | 0.49 | 1.40 | 1.91 | 2.19 | 2.31 |
| | | | | 0.49 | 1.43 | 1.94 | 2.23 | 2.35 | |
| | 3 | | | Aus Hefe, nachdem 2 Stdn. mit Toluol und Wasser durchgerührt | 0.54 | 1.46 | 1.94 | 2.20 | 2.31 |
| | | | | | 0.54 | 1.46 | 1.95 | 2.21 | 2.31 |
| II. | 4 | 21. Januar 1914 | Münchener Unterhefe | Ohne Kochsaff (Kontrolle) | 0.49 | 0.80 | 0.94 | 0.96 | 0.96 |
| | | | | 0.49 | 0.81 | 0.93 | 0.95 | 0.95 | |
| | 5 | | | Aus Hefe, nachdem 20 Stdn. mit Wasser geschüttelt | 0.45 | 1.03 | 1.43 | 1.66 | 1.85 |
| | | | | 0.48 | 1.06 | 1.44 | 1.67 | 1.86 | |
| | 6 | | | Aus Hefe, nachdem 20 Stdn. mit Toluol u. Wasser durchgeschüttelt | 0.42 | 0.89 | 1.18 | 1.33 | 1.41 |
| | | | | | 0.41 | 0.88 | 1.17 | 1.32 | 1.39 |

Tabelle IV gibt Vergleichsversuche über die Schwankungen der Gärkraft beim Auffrischen und Lagern der Hefe wieder. Die Hefe kam hierbei in 20-prozentiger Zuckerlösung, d. h. ohne jede Stickstoffnahrung, zur Aufstellung: im Höhepunkt der Gärung, nach ca. 6 Stunden, wurde durch Eiszusatz die Temperatur rasch auf 5° herabgedrückt, worauf die Gärung stillstand. Nachdem die Hefe sich abgesetzt hatte, wurde durch Abhebern der überstehenden Lösung und zweimaligen Ersatz durch Eiswasser der Zucker entfernt und durch Abpressen bei 200 Atmosphären die Hefe entwässert. Ein Teil derselben wurde dann in eine Blechbüchse fest eingepreßt, und diese in Eiswasser eingesenkt und 15 Stunden aufbewahrt, wobei die Temperatur der Hefe 1.5° betrug. Vor Beginn des Versuches, nach dem Abbrechen der Gärung und nach dem Lagern der Hefe wurde ein Teil davon jedesmal auf Aceton-Dauerhefe bezw. Kochsaff verarbeitet. Von den so erhaltenen 3 Dauerpräparaten,

Tabelle IV. **Schwankungen der Gärkraft**
beim Auffrischen und Lagern der Hefe.

Je 2 g Dauerhefe (hergestellt aus Hefe sofort, bezw. nach Auffrischen, bezw. nach Auffrischen und Lagern) in Rohrzuckerlösung von 29% + Toluol ohne bezw. mit Kochsaff; 22°.

| Versuchsreihe | Nr. | Datum | Hefeart | Aufgefrischt | Hernach gelagert | Kochsaff-zusatz | Kohlendioxyd in g nach Tagen | | | | |
|---------------|-----|------------------|----------------------|--|---------------------------|-----------------|------------------------------|------|------|------|---------|
| | | | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | Endzahl |
| I. | 1 | 13. Januar 1914 | Würzburger Unterhefe | Nicht behandelt (Kontrolle) | | ohne | 0.49 | 0.80 | 0.94 | 0.96 | 0.96 |
| | 2 | | | | | mit | 0.49 | 0.81 | 0.93 | 0.95 | 0.95 |
| | 3 | | | In Rohrzuckerlösung von 20%, 6 Stdn. bei 9—14° | nicht gelagert | ohne | 0.41 | 0.60 | 0.66 | 0.67 | 0.67 |
| | 4 | | | | | mit | 0.42 | 0.59 | 0.63 | 0.64 | 0.64 |
| | 5 | | | | 15 Stdn. bei 15° gelagert | ohne | 0.48 | 0.86 | 1.26 | 1.48 | 1.85 |
| | 6 | | | | | mit | 0.49 | 0.87 | 1.27 | 1.51 | 1.89 |
| II. | 7 | 28. Januar 1914 | Münchener Unterhefe | Nicht behandelt (Kontrolle) | | ohne | 0.54 | 0.78 | 0.89 | 0.90 | 0.90 |
| | 8 | | | | | mit | 0.58 | 0.83 | 0.94 | 0.95 | 0.95 |
| | 9 | | | In Rohrzuckerlösung von 20%, 6 Stdn. bei 8—15° | nicht gelagert | ohne | 0.69 | 1.18 | 1.63 | 1.90 | 2.21 |
| | 10 | | | | | mit | 0.68 | 1.19 | 1.62 | 1.89 | 2.21 |
| | 11 | | | | 15 Stdn. bei 15° gelagert | ohne | 0.40 | 0.58 | 0.66 | 0.67 | 0.67 |
| | 12 | | | | | mit | 0.41 | 0.61 | 0.69 | 0.69 | 0.69 |
| III. | 13 | 10. Februar 1914 | Würzburger Unterhefe | Nicht behandelt (Kontrolle) | | ohne | 0.57 | 0.93 | 1.27 | 1.47 | 1.71 |
| | 14 | | | | | mit | 0.57 | 0.94 | 1.27 | 1.48 | 1.72 |
| | 15 | | | In Rohrzuckerlösung von 20%, 6 Stdn. bei 9—14° | nicht gelagert | ohne | 0.39 | 0.61 | 0.70 | 0.71 | 0.71 |
| | 16 | | | | | mit | 0.40 | 0.65 | 0.76 | 0.77 | 0.77 |
| | 17 | | | | 15 Stdn. bei 15° gelagert | ohne | 0.68 | 1.13 | 1.48 | 1.70 | 1.97 |
| | 18 | | | | | mit | 0.71 | 1.08 | 1.43 | 1.64 | 1.93 |
| | 13 | 10. Februar 1914 | Würzburger Unterhefe | Nicht behandelt (Kontrolle) | | ohne | 0.46 | 0.75 | 0.90 | 0.91 | 0.91 |
| | 14 | | | | | mit | 0.46 | 0.74 | 0.89 | 0.91 | 0.91 |
| | 15 | | | In Rohrzuckerlösung von 20%, 6 Stdn. bei 9—14° | nicht gelagert | ohne | 0.62 | 1.12 | 1.67 | 1.98 | 2.34 |
| | 16 | | | | | mit | 0.61 | 1.12 | 1.67 | 1.98 | 2.35 |
| | 17 | | | | 15 Stdn. bei 15° gelagert | ohne | 0.49 | 0.74 | 0.82 | 0.82 | 0.82 |
| | 18 | | | | | mit | 0.53 | 0.77 | 0.83 | 0.83 | 0.83 |
| | 15 | 10. Februar 1914 | Würzburger Unterhefe | Nicht behandelt (Kontrolle) | | ohne | 0.65 | 1.13 | 1.65 | 1.92 | 2.12 |
| | 16 | | | | | mit | 0.67 | 1.15 | 1.66 | 1.93 | 2.14 |
| | 17 | | | In Rohrzuckerlösung von 20%, 6 Stdn. bei 9—14° | nicht gelagert | ohne | 0.47 | 0.74 | 0.85 | 0.85 | 0.85 |
| | 18 | | | | | mit | 0.57 | 0.82 | 0.90 | 0.90 | 0.90 |
| | 19 | | | | 15 Stdn. bei 15° gelagert | ohne | 0.75 | 1.27 | 1.80 | 2.07 | 2.28 |
| | 20 | | | | | mit | 0.76 | 1.30 | 1.83 | 2.10 | 2.30 |

deren Ausbeute innerhalb jeder Versuchsreihe konstant war (27%, 26.7%, 26%), wurden in üblicher Weise die Gärversuche ohne und mit Kochsaff angestellt. Dabei zeigte sich in den Versuchen ohne Kochsaff ein erheblicher Abfall der Gärwirkung nach dem Auffrischen und eine ziemlich geringe Steigerung bei darauffolgendem Lagern. Diese Unterschiede könnten durch wechselnden Gehalt an Ko-enzym mitbedingt sein. Die Versuche mit Kochsaffzusatz lassen aber deutlich ein Sinken der Gärwirkung nach dem Auffrischen und eine namhafte Steigerung durch das Lagern erkennen, was nur auf Abnahme an Zymase beim Auffrischen und auf Neubildung von solcher beim Lagern zurückgeführt werden kann.

Die in den einzelnen Stadien unter gleichen Bedingungen hergestellten Kochsäfte, deren Wirkung auf ein und dieselbe Aceton-Dauerhefe in Tabelle IVa wiedergegeben ist, zeigen keine wesentliche Änderung infolge des Auffrischens, dagegen eine deutliche Abnahme des Ko-enzymgehaltes beim Lagern, wodurch die obigen Ausführungen über die Zymasebildung bestätigt werden.

Tabelle IVa.

Schwankungen des Ko-enzym-Gehaltes

beim Auffrischen und Lagern der Hefe.

Je 20 ccm Kochsaff aus Hefe sofort bzw. nach Auffrischen bzw. nach Auffrischen und Lagern, versetzt mit je 2 g Aceton-Dauerhefe + 8 g Rohrzucker + Toluol; zur Kontrolle ferner dieselbe Dauerhefe in 29-prozentiger Zuckerlösung + Toluol; 22°.

| Versuchsreihe | Nr. | Datum | Hefeart | Herstellung des Kochsaffes | Kohlendioxyd in g nach Tagen | | | | |
|---------------|--|------------------|----------------------|----------------------------|------------------------------|------|------|------|---------|
| | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | Endzahl |
| I. | 1 | 28. Januar 1914 | Münchener Unterhefe | Ohne Kochsaff (Kontrolle) | 0.72 | 0.93 | 0.97 | — | 0.97 |
| | | | | | 0.63 | 0.87 | 0.92 | — | 0.92 |
| | 2 | | | Aus Hefe vor Behandlung | 0.52 | 1.03 | — | 1.56 | 1.80 |
| | | | | | 0.54 | 1.06 | — | 1.61 | 1.89 |
| 3 | Aus aufgefrischter Hefe | 0.61 | 1.14 | — | 1.65 | 1.83 | | | |
| | | 0.61 | 1.12 | — | 1.64 | 1.83 | | | |
| 4 | Aus aufgefrischter und gelagerter Hefe | 0.47 | 0.92 | — | 1.35 | 1.50 | | | |
| | | 0.48 | 0.92 | — | 1.36 | 1.50 | | | |
| II. | 5 | 10. Februar 1914 | Würzburger Unterhefe | Ohne Kochsaff (Kontrolle) | 0.46 | 0.75 | 0.90 | 0.91 | 0.91 |
| | | | | | 0.46 | 0.74 | 0.89 | 0.91 | 0.91 |
| | 6 | | | Aus Hefe vor Behandlung | 0.52 | 0.98 | 1.30 | 1.48 | 1.55 |
| | | | | | 0.52 | 0.99 | 1.31 | 1.49 | 1.58 |
| 7 | Aus aufgefrischter Hefe | 0.52 | 0.99 | 1.29 | 1.45 | 1.51 | | | |
| | | 0.51 | 0.96 | 1.26 | 1.42 | 1.48 | | | |
| 8 | Aus aufgefrischter und gelagerter Hefe | 0.51 | 0.93 | 1.16 | 1.27 | 1.28 | | | |
| | | 0.53 | 0.94 | 1.17 | 1.25 | 1.26 | | | |