

Neue Versuche mit Hefepresssaft. ¹⁾

Von

Jakob Meisenheimer.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Landwirthschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 13. März 1903.)

Gährung durch Hefepresssaft in stark verdünnten Lösungen.

Bekanntlich wirken viele Enzyme auch noch bei grosser Verdünnung sehr energisch. Es erschien von Interesse, zu untersuchen, ob auch die Zymase in stark verdünnten Lösungen noch Wirksamkeit auszuüben im Stande ist, um so mehr, als von anderer Seite, A. Macfadyen, G. H. Morris und S. Rowland, ²⁾ es geradezu als ein schwerwiegendes Argument gegen die Enzymnatur der Zymase betrachtet worden ist, dass nach ihren Versuchen die Gährkraft des Presssaftes schon durch Verdünnung mit nur einem Volumen Wasser fast vernichtet werden sollte. Die Angaben der englischen Forscher sind für ein-[†] bis vierfache Verdünnung bereits an anderer Stelle ³⁾ widerlegt worden; im Folgenden wird der Beweis erbracht, dass der Hefepresssaft selbst bei 25facher Verdünnung noch beträchtliche Gährung hervorzurufen im Stande ist.

Wegen der für diese Versuche nothwendigen grossen Flüssigkeitsmengen und des damit verbundenen hohen Gewichts der Apparate konnte die sonst übliche Bestimmungsmethode der Kohlensäure aus dem Gewichtsverlust nicht in Anwendung kommen; die Kohlensäure musste vielmehr direkt zur Wägung gebracht werden. Das Verfahren war folgendes:

¹⁾ Die Resultate meiner Untersuchungen, welche auf Anregung von Herrn Professor E. Buchner ausgeführt wurden, sind theilweise bereits in die kürzlich erschienene Monographie «Die Zymasegährung» von E. und H. Buchner und M. Hahn (München und Berlin, 1903) aufgenommen worden.

Alle Versuche wurden mit Presssaft aus untergähriger Hefe angestellt, für deren Ueberlassung ich der hiesigen Schulttheissbrauerei zu Dank verpflichtet bin.

²⁾ Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 33, 2784 (1900).

³⁾ Ed. Buchner, Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 32, 2093 (1899);
Wochenschrift f. Brauerei, Bd. 18, No. 15 (1901).

Die Flüssigkeit befand sich in einem grossen, durch einen doppelt durchbohrten Kautschuckstopfen verschlossenen Kolben. Durch die Bohrungen führten zwei Glasröhren, die eine, die Gaszuleitungsröhre, tauchte bis in die Flüssigkeit, die andere schnitt mit dem Stopfen ab. Das aus der letzteren austretende Gas wurde zunächst in zwei U-förmigen Chlorcalciumröhren vollständig getrocknet, passirte dann einen gewogenen Kaliapparat und trat endlich durch ein weiteres Chlorcalciumrohr, welches zum Schutz gegen von aussen eindringende Feuchtigkeit vorgelegt war, aus. Nach Beendigung des Versuches (1 bis 3 Tagen) wurde der Kolben zum Sieden erhitzt und zur völligen Verdrängung der Kohlensäure durch das ganze System Luft hindurchgeleitet. Alle Versuche wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt. Als Antisepticum dienten wechselnde Mengen Thymol, welche sich stets als ausreichend erwiesen: in keinem Falle konnte Bacterienwachstum oder Pilzwucherung beobachtet werden.

Bei den ersten Versuchen (vergl. Tab. I, 1. u. 2.) wurden 20 cem frischer Presssaft, dessen Gährkraft unter gewöhnlichen Bedingungen nebenher bestimmt wurde, mit 500 cem einer verdünnten Salzlösung vermischt, welcher 1 bzw. 2 % Rohrzucker zugesetzt waren. Kohlensäureentwicklung war während der Dauer des Versuches nicht zu beobachten. Nach drei Tagen wurde zum Sieden erhitzt und Luft emgeleitet, es ergab sich eine Zunahme des Kaliapparates von 0,034 bzw. 0,030 g. Gärung war also nicht mit Sicherheit nachzuweisen. Ein etwas günstigeres Resultat wurde erhalten, als 20 cem Presssaft mit 500 cem zehnpocentiger Glycerinlösung unter Zusatz von 5 g Rohrzucker verdünnt wurden: bereits nach 24 Stunden wurden 0,08 g Kohlensäure gefunden.

Als viel günstigeres Verdünnungsmittel erwies sich eine zehnpocentige Hühnereiweisslösung. In einer Reihe von Versuchen, bei welchen bald 1, bald 2 % Rohrzucker zugegeben waren, konnte stets eine ganz beträchtliche Gährwirkung constatirt werden. In einem Falle (No. 6 der Tabelle) lieferten 20 cem Presssaft nach dem Verdünnen mit 500 cem zehnpocentiger Hühnereiweisslösung (bei Gegenwart von 2 % Rohr-

zucker) sogar 80 % der Kohlensäuremenge, welche das gleiche Quantum Presssaft unverdünnt unter normalen Bedingungen zu entwickeln im Stande war.

Tabelle I.

Gährwirkung durch sehr verdünnten Presssaft.

Je 20 ccm Saft + 500 (bezw. 250) ccm Verdünnungsmittel + 5 bis 10 g Rohrzucker + 0.15 bis 1 g Thymol; Zimmertemperatur.

No.	Presssaft	20 ccm Presssaft geben bei 22° mit 8 g Rohrzucker + 0.2 ccm Thymol nach 96 Stunden	20 ccm Presssaft verdünnt mit	Rohrzucker-zusatz in g	Thymolzusatz in g	Versuchsdauer in Stunden	CO ₂ in g nach Erwärmen und Luftdurchleiten
1	20	0.97 g CO ₂	500 ccm wässrige Salzlösung enthaltend: 5 g K ₂ HPO ₄ + 2 g (MgSO ₄ + 7H ₂ O) + 2 g NaCl + 1 g CaSO ₄	5	1	72	0.034
2	20	0.97 „ „	„ „	10	1	72	0.030
3	20	0.95 „ „	500 ccm Glycerinlösung (10%)	5	0.2	72	0.08
4	20	0.95 „ „	500 ccm Hühner-eiweisslösung (10%)	5	0.2	24	0.27
5	20	0.95 „ „	„ „	5	0.2	24	0.30
6	20	1.20 „ „	„ „	10	0.3	72	0.97
7	20	1.20 „ „	„ „	10	0.3	72	0.79
8	20	1.60 „ „	500 ccm Hühner-eiweisslös. (10%) + 5 g (Na ₂ HPO ₄ + 10H ₂ O)	10	0.3	72	0.60
9	20	1.05 „ „	250 ccm Hühner-eiweisslösung (10%)	5	0.15	72	0.27
10	—	—	„ „	5	0.15	72	0.01

Obwohl in keinem Falle Wachstum von Organismen wahrgenommen werden konnte, war doch die Möglichkeit nicht ganz von der Hand zu weisen, dass die schliesslichen Erfolge auf Infection durch lebende Zellen zurückzuführen waren. Auch die negativen Resultate der ersten Versuche schlossen eine solche Annahme nicht absolut aus, da die concentrirte Eiweisslösung natürlich einen viel besseren Nährboden für Organismen

abgeben musste als die verdünnten Salzlösungen. Um auch diese letzte Möglichkeit zu beseitigen, wurden noch folgende zwei Parallelversuche (No. 9 und 10 der Tabelle) nebeneinander durchgeführt:

In dem einen wurde zu 250 ccm Hühnereiweisslösung von 10% mit 2% Rohrzuckergehalt noch 20 ccm frischer Presssaft zugefügt, im anderen unterblieb dieser Zusatz. Nach 72stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde die gebildete Kohlensäure in der oben angegebenen Weise bestimmt. Der Unterschied war evident: Im ersten Falle verlief die Gärung normal (gefunden 0,27 g CO₂), im letzten war eine Zunahme des Kaliapparates so gut wie nicht erfolgt (um 0,01 g).

Fassen wir die Resultate sämtlicher Experimente zusammen, so ergibt sich, dass die Zymase auch noch in starker Verdünnung Zucker vergäht, jedoch nur bei Gegenwart grösserer Eiweissmengen in beträchtlichem Maasse. Die Wirkung der Eiweissstoffe ist vielleicht auf zwei Ursachen zurückzuführen. Erstens dürfte durch dieselben die Zymase vor einem allzurachen Angriff durch die proteolytischen Enzyme des Saftes geschützt werden; zweitens könnte die colloidale Natur der Eiweisskörper dabei eine Rolle spielen. Es ist eine auch anderwärts¹⁾ wiederholt gemachte Erfahrung, dass colloidal gelöste Körper die Beständigkeit anderer Colloidsubstanzen in derselben Lösung erhöhen.

Fällung von Hefepresssaft mit Aceton.

R. Albert und E. Buchner²⁾ haben vor einigen Jahren gefunden, dass man durch Eintragen von Presssaft in eine Alkoholäthernischung das wirksame Agens, die Zymase, gemengt mit anderen Eiweissstoffen, ohne Einbusse an Gärkraft als trockenes Pulver niederschlagen kann. Bereits damals waren auch von R. Rapp³⁾ mit Aceton ähnliche Versuche angestellt worden, aber mit weniger günstigem Resultat. Es gingen bei der Fällung die Hälfte bis zwei Drittel der Gähr-

1) Vergl. C. Paal, Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 35, 2209 (1902).

2) Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 33, 266, 971 (1900).

3) Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 33, 267 (1900).

kraft verloren. Nachdem sich später das Acetonverfahren zur Darstellung von Dauerhefe so vorzüglich bewährt hatte, erschienen die Versuche mit Presssaft einer Revision bedürftig: offenbar war die Menge Aceton (auf einen Theil Presssaft vier Theile Aceton) zu gering bemessen worden. In der That erhält man bei Anwendung von mehr Aceton (zelm Theilen) Niederschläge, die den Alkoholäther-Fällungen vollkommen gleichwerthig sind und ebenso wie diese manchmal höhere Gährkraft besitzen, als das entsprechende Quantum Presssaft. Letzteres ist wohl so zu erklären, dass die proteolytischen Enzyme des Saftes durch die angewendeten Fällungsmittel stärker geschädigt werden als die Zymase.

Es wurden folgende Versuche angestellt:

1. 100 cem Presssaft wurden unter heftigem Rühren in 1000 cem auf -2° gekühltes Aceton eingetragen. Der flockige, weisse Niederschlag wurde abgesaugt und zweimal mit Aether gewaschen, wobei er eine etwas schmierige Beschaffenheit annahm. Nach dem Trocknen im Vacuum bildete er eine zerreibliche, hornartige Masse. Ausbeute: 13,6 g. Zur Bestimmung der Gährkraft wurden 2,7 g (entsprechend 20 cem Saft) in einem Erlenmeyer-Kolben mit Meissl'schem Gährverschluss mit 19 cem Wasser unter Zusatz von 8 g Zucker und 0,2 cem Toluol verührt und in einen Thermostaten von 22° gebracht; zum Vergleich wurde auch die Gährkraft des frischen Saftes ermittelt. (Vergl. Tab. II.)

Tabelle II.

Gährkraft der Acetonfällungen.

Je 20 cem Saft (bezw. die entsprechende Menge Niederschlag + 19 cem Wasser) + 8 g Rohrzucker + 0,2 cem Toluol: $22-23^{\circ}$.

No.	100 cem Presssaft eingetragen in	Ausbeute an Niederschlag	Kohlendioxyd in 96 Stunden
1	1000 cem Aceton	13,6 g	1,27 g
2	Saft vor der Fällung	—	1,40 g
3	1000 cem Aceton	12 g	1,20 g
4	Saft vor der Fällung	—	0,96 g

2. 100 ccm Presssaft wurden unter Turbinieren in 1000 ccm Aceton bei 15 ° einfließen gelassen, der Niederschlag zweimal mit je 50 ccm Alkohol und schliesslich mit Aether gewaschen und im Vacuum getrocknet. Fast farbloses, staubtrocknes Pulver. Ausbeute 12 g. Die Gährkraft wurde mit der 20 ccm frischem Presssaft entsprechenden Menge (2,4 g) wie oben ausgeführt.

Concentriren von Hefepresssaft durch Ausfrieren.

F. B. Ahrens hat eine Methode angegeben, durch Ausfrieren Hefepresssaft zu concentriren:¹⁾ Frischer Presssaft wurde in einer Kältemischung auf -2° gekühlt und der beim Umrühren abgeschiedene Eisbrei durch schnelles Abpressen in der Kälte von der Flüssigkeit getrennt. Durch mehrmalige Wiederholung dieser Operation gelang es ihm, einen Saft von 1,0765 specifischem Gewicht zu gewinnen, während das specifische Gewicht eines gewöhnlichen Presssaftes aus Berliner oder Münchener untergähriger Hefe nach Ed. Buchner zwischen 1,032—1,050 schwankt. Ich habe die Angaben von Ahrens nachgeprüft und die Gährkraft der erhaltenen concentrirten Säfte quantitativ bestimmt. Die Methode ist in der That sehr zweckmässig, um Presssaft von starker Gährwirkung zu gewinnen. Es ist jedoch nicht nöthig, von dem zunächst abgeschiedenen Eis abzupressen; vorthellhafter lässt man den Saft in einer guten Kältemischung in engen, hohen Glascylindern vollständig erstarren und dann langsam, ohne die Flüssigkeit umzuschütteln, wieder aufthauen. Die concentrirtesten und deshalb am niedrigsten schmelzenden Antheile thauen zuerst wieder auf und sammeln sich am Boden des Cylinders an, während das specifisch leichtere Eis nach oben schwimmt. Nachdem Alles wieder geschmolzen ist, ist der obere Theil der Flüssigkeit fast farblos; die Färbung nimmt nach unten allmählich zu bis zu der intensiv rothbraunen untersten Schicht. Die oberste Zone ist fast reines Wasser und hat nur ganz schwache, resp. gar keine Gährkraft; die unterste ist hoch concentrirter Presssaft von sehr starker Gährwirkung. Es wurden zwei Versuche mit dem gleichen

1. Zeitschrift für angew. Chemie 1900, 483.

Presssaft angestellt, dessen Gährkraft zur Controlle ebenfalls bestimmt wurde.

1. Versuch: 150 ccm frischer Presssaft wurden in einem engen Glaszylinder durch Einstellen in eine Eis-Kochsalz-Kältemischung im Verlaufe von etwa 3 Stunden zum Erstarren gebracht. Alsdann wurde der Cylinder in Wasser von 3—5° eingetaucht: nach 1½ Stunden war Alles wieder geschmolzen. Die oberen Theile der Flüssigkeit waren nunmehr viel heller gefärbt als die unteren. Zur Gährkraftbestimmung wurden die einzelnen Zonen (je 20 ccm) vorsichtig, ohne die Flüssigkeit durchzurühren, mit einer Pipette abgehoben und mit 8 g Rohrzucker und 0,2 ccm Toluol bei 22° in der üblichen Weise angesetzt. Es wurden folgende Proben entnommen: Zuerst die obersten 20 ccm (1—20; Tab. III, No. 2), dann die folgenden (21—40; No. 3); die nächsten 70 ccm wurden nicht untersucht, darauf wieder die vorletzten 20 ccm von 111—130 (No. 4) und schliesslich die unterste Schicht, 131—150 (No. 5).

Tabelle III.

Concentriren des Presssaftes durch Schichtenbildung beim Gefrieren und Aufthauen.

Je 20 ccm Saft + 8 g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol: 22°.

No.	Herkunft der Probe	Kohlendioxyd in g nach Stunden			
		24	48	72	96
1	frischer Presssaft (Controlle)	0,86	1,11	1,13	1,14
		0,85	1,15	1,19	1,20
2	ccm 1—20 (oberste Schicht)	0,43	0,52	0,52	0,53
3	21—40	0,49	0,60	0,61	0,61
4	111—130	1,04	1,40	1,46	1,48
5	131—150 (unterste Schicht)	1,11	1,49	1,66	1,69
6	ccm 1—20 (oberste Schicht)	0,037	0,047	0,048	0,049
7	81—100 (unterste Schicht)	1,22	1,63	1,73	1,75

2. Versuch: 100 ccm des gleichen Presssaftes wurden in einem engen Glaszylinder wie oben in eine Kältemischung

gebracht. Nach dem völligen Erstarren wurde jedoch das Gefäß nicht herausgenommen, sondern in der Kältemischung belassen, sodass die Masse sehr langsam, in ca. 15 Stunden, zusammen mit der Kältemischung wieder aufthaute. Die oberste Zone der Flüssigkeit war nunmehr völlig farblos, die unterste tiefbraun. Es wurde die Gährkraft der obersten (No. 6) und der untersten Schicht (No. 7, je 20 cem) bestimmt.

Aus den beiden Versuchen, namentlich dem letzteren, geht hervor, dass man Presssaft durch Ausfrieren und sehr vorsichtiges Wiederaufthauen in zwei Schichten trennen kann, eine obere farblose, zymasearme Schicht und eine untere, intensiv gefärbte Zone von höherer Gährkraft, als der ursprüngliche Saft sie aufwies. Der letzte Versuch lehrt ausserdem, dass man Presssaft über Nacht am besten in einer Kältemischung aufbewahrt: verwirft man nach dem Wiederaufthauen die obere Hälfte, so hat man im unteren Theile sogar einen Presssaft von stärkerer Wirksamkeit, als am Tage zuvor der frische Saft zeigte.

Hefepresssaft und Gram'sche Färbung.

R. Trommsdorff¹⁾ hat gefunden, dass durch Alkohol-äthemischung gefällter Hefepresssaft mit der Gram'schen Färbung und Safranin nachfärbung sich nicht wie Alkoholäther-Dauerhefe²⁾ schwarzblau, sondern nur roth färbt. Er zieht daraus den Schluss, dass die Eiweissstoffe der Hefe wohl nicht unverändert in den Presssaft übergangen, wie R. und W. Albert³⁾ vermuthet haben.

Ich habe frischen Presssaft in ähnlicher Weise zu färben versucht. Ein Tröpfchen von frischem Presssaft wurde in einigen Secunden auf einem Deckgläschen durch Luftaufblasen eingetrocknet, und der Rückstand nach Gram gefärbt und mit Safranin nachgefärbt; das Präparat färbte sich lediglich roth, genau wie dies Trommsdorff für gefällten Presssaft festgestellt hat.

1) Centralblatt f. Bacteriologie, Abtheilung II, Bd. 8, 81 (1902).

2) R. u. W. Albert, Centralblatt f. Bacteriologie, Abtheilung II, Bd. 7, 737 (1901).

3) l. c.

Trotzdem schien mir die Schlussfolgerung Trommsdorff's unberechtigt zu sein. Denn es war doch von vornherein wenig wahrscheinlich, dass die Eiweissstoffe der Hefe durch blosses Zerreiben und Auspressen, Operationen, die leicht in kürzester Frist ausgeführt werden können, bereits eine tiefgreifende Veränderung erleiden sollten. Viel näher lag die Vermuthung, dass die nach Gram sich schwarzblau färbenden Bestandtheile der Hefe ungelöst in der Zelle vorhanden sind und demnach nicht in den Presssaft übergehen können, sondern im rückständigen Presskuchen verbleiben. Diese Annahme konnte leicht als richtig erkannt werden: Die zerrissenen Zellen des Presskuchens färben sich nach Gram eben so schön und intensiv dunkelblau, wie die ursprüngliche Hefe.

Ausserdem sind seit einiger Zeit Versuche über Essig- und Milchsäurebildung bei der zellfreien Gährung im Gange. Dieselben sind jedoch in Folge der Schwierigkeit, welche die Abtrennung derartiger, nur in geringen Mengen auftretender Nebenproducte von der gewaltigen Masse der Eiweissstoffe des Presssaftes darbietet,¹⁾ noch nicht ganz zum Abschluss gekommen, und seien hier nur kurz die bisher gewonnenen Resultate mitgetheilt.

Ebenso wie bei der alkoholischen Gährung durch lebende Hefezellen entstehen auch bei der zellfreien Gährung flüchtige Säuren nur in sehr untergeordnetem Maasse, etwa 0,2—0,5 % vom Zuckergewicht. Wichtiger ist die Bildung von Milchsäure, welche bei der Gährung durch lebende Zellen überhaupt nicht auftritt. In einem Versuche fanden sich 2,5 % des vergohrenen Zuckers als Milchsäure wieder, doch ist diese Zahl in Folge der schon oben angedeuteten Schwierigkeit der Isolirung sicherlich noch zu niedrig.

Die erste Angabe über Bildung nicht flüchtiger Säuren im Presssaft stammt von F. B. Ahrens.²⁾ Er stellte eine allmähliche Zunahme der Säure fest, deren Menge er durch Titration ermittelte und auf Milchsäure berechnete, ohne jedoch die Säure auch als Milchsäure zu charakterisiren.

¹⁾ Vergl. E. Buchner u. R. Rapp, Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 34. 1526 (1901).

²⁾ Zeitschrift für angew. Chemie, 1900, 483 ff.