

Herstellung glykogenarmer Hefe und deren Anwendung zum Zuckernachweis im Harn.

Von

Eduard Buchner und Sigurd Mitscherlich.

(Aus dem chem. Laboratorium der landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.
(Der Redaktion zugegangen am 16. August 1904.)

Die aus den Brauereien bezogene untergärige Hefe besitzt einen schwankenden Gehalt an Glykogen, welcher sich bei manchen Versuchen störend bemerkbar macht. Stellt man zum Beispiel aus der Hefe Preßsaft her, so zeigt sich in diesem auch ohne Zufügen von Zucker die Erscheinung der sogenannten Selbstgärung,¹⁾ welche zwar in der Regel nicht mehr als 10% der Menge Kohlendioxyd liefert, die gärkräftiger Saft nach Zuckerzusatz entwickelt, aber doch das klare Bild der zellfreien Gärung verschleiert. Ebenso enthält auch die aus solcher Hefe durch Einwirkung von Aceton und Äther dargestellte Acetondauerhefe noch Glykogen und entwickelt, mit Wasser befeuchtet, ohne Zuckerzusatz, Kohlendioxyd.

Wir haben deshalb versucht, das Glykogen aus den Zellen nach Möglichkeit zu entfernen, ohne jedoch zugleich den Zymasegehalt und damit die Gärkraft zu schädigen. Unter Benützung der Erfahrungen von W. Henneberg²⁾ gelang es leicht, dieses Ziel zu erreichen.

Läßt man die Hefe unter Wasser bei Zimmertemperatur liegen, so verschwindet das Glykogen nur sehr allmählich, rascher bei Temperaturen von 30—40° C., wobei aber auch die Gärkraft merklich abnimmt. Wesentlich bessere Ergebnisse lieferte einfaches Ausbreiten der abgepreßten und gesiebten Hefe in dünner Schicht an der Luft. Unter diesen Bedingungen ist im Eisschrank (bei etwa + 2° C.) nach ungefähr einem Tage kein Glykogen mehr nachzuweisen, bei Zimmertemperatur (etwa 20° C.) in ungefähr 8 Stunden, im Thermostaten (bei 35 bis 45° C.) schon in 3—4 Stunden. Eine Schädigung der Gärkraft tritt hierbei meistens nicht ein, im Gegenteil haben wir in einigen Fällen eine Zunahme derselben konstatieren können.

¹⁾ Buchner und Rapp, Berichte d. d. chem. Gesellsch., Bd. 32, S. 2090 (1899).

²⁾ Wochenschrift für Brauerei, Bd. 19, S. 651 (1902).

Die bei dieser Art des Lagerns reichliche Einwirkung der Luft scheint für die Herabminderung des Glykogengehalts ohne Bedeutung zu sein, da das Kohlenhydrat nach vorläufigen Versuchen ebenso rasch auch beim Ausbreiten der Hefe in Kohlen-säureatmosphäre oder im Vacuum bei 40° C. verschwindet. Vielleicht ist der eintretende Nahrungsmangel als Ursache der Glykogenabnahme zu betrachten, denn dieser komplizierte Zucker ist wohl ohne Zweifel als eine Art von Reservestoff aufzufassen.¹⁾ Das Verschwinden des Glykogens ist wahrscheinlich auf das Auftreten eines besonderen, diastaseähnlichen Enzymes von hydrolytischer Wirkung zurückzuführen: die entstehende Hexose wird vermutlich sofort assimiliert oder vergoren oder veratmet.

Zur Prüfung auf Glykogen haben wir es nicht bei der einfachen Jodfärbung bewenden lassen, sondern Hefepreßsaft bzw. Acetondauerhefe hergestellt, die im Gegensatz zu den gleichen Präparaten aus der ursprünglichen Hefe fast gar keine Selbstgärung mehr zeigten, bei Zuckerzusatz aber starke Gärkraft aufwiesen. Die Abnahme der Selbstgärung gestattet, einen Schluß auf die quantitativen Mengen an Glykogen in den Hefezellen zu ziehen. Gemäß der Gärungsgleichung erscheint ungefähr die Hälfte des Zuckergewichtes nach der Gärung wieder als Kohlendioxyd; unter Berücksichtigung des Umstandes, daß das Glykogen vor der Vergärung erst hydrolysiert werden muß, darf man annehmen, daß die Kohlensäuremenge etwa 55% des ursprünglichen Glykogengewichtes repräsentiert. Unter Zugrundelegung dieser Verhältnisse berechnet sich z. B. für Versuch 7 (s. u. Tab. IV) ein Glykogengehalt des Acetondauerpräparates aus der ursprünglichen Hefe von 13,5% des gleichen Präparates aus der glykogenarm gemachten Hefe von 1,8%.²⁾

¹⁾ Henneberg, a. a. O. Bd. 19, S. 652 (1902) spricht die entgegengesetzte Ansicht aus, was uns unverständlich bleibt und auch aus seinen Versuchsergebnissen nicht hervorzugehen scheint.

²⁾ Während der Ausführung unserer letzten Versuche sind von W. Henneberg neue Studien über das Verhalten einiger Kulturheferassen bei verschiedenen Temperaturen veröffentlicht worden, bei welchen unter anderem auch der Glykogengehalt verfolgt wurde. (Wochenschr. f. Brauerei, Bd. 21, S. 376, 402, 449, 458, 474 (1904).) Die Resultate stimmen vielfach mit den unseren überein; der Verfasser hat sich indes stets mit der Jodfärbung zum qualitativen Nachweis des Kohlenhydrats begnügt.

Für die Zuckerbestimmung im Harn

scheint ein Bedürfnis nach einem Dauerhefepräparat vorzuliegen, welches eine gute Gärkraft, aber keine Selbstgärung besitzt. Auch bei Anwendung lebender Hefe kann hoher Glykogengehalt der Zellen unter Umständen Zuckergehalt im Harn vortäuschen.¹⁾ Die bisher unter dem Namen Zymin im Handel befindliche Acetondauerhefe eignet sich, wie E. Münzer-Prag²⁾ nachgewiesen hat und Paul Kraus e-Breslau³⁾ bestätigt, wegen ihres Glykogengehalts nicht für die Zuckerbestimmung. Nunmehr kann ein Präparat zur Verfügung gestellt werden, welches den Anforderungen entspricht.⁴⁾ Da die Dauerhefe sich in dem diabetischen Harn zu Boden setzen würde, was eine ungenügende Einwirkung zur Folge hätte,⁵⁾ fügt man dem allenfalls verdünnten Harn 1 Volumen konzentriertes Glycerin zu, wodurch zugleich eine Entwicklung von Mikroorganismen verhindert wird.⁶⁾

Für die Überlassung vorzüglicher Unterhefe sind wir der Schultheiß-Brauerei, A.-G., Berlin (Laboratoriumsvorsteher Herr Dr. Gronow), zu großem Dank verpflichtet.

Experimentelles.

Die ersten Versuche in größerem Maßstab erfolgten in der Weise, daß die gewaschene, stark glykogenhaltige, in der hydraulischen Presse von Wasser möglichst befreite Hefe mittels Durchtreibens durch ein feines Drahtsieb (Maschenweite 1 mm) in dünner Schichte auf Filtrierpapier ausgebreitet und 20 Stunden im Eisschrank aufbewahrt wurde. (Versuch Nr. 1, Tab. I.) Beim zweiten Versuch war nach 20 Stunden das Glycerin noch nicht vollständig verschwunden und die Hefe wurde deshalb nochmals 4 Stunden bei 20° gelagert. (Tab. I, Nr. 2.) Nachdem die Jodreaktion negativ ausgefallen war, wurde nach dem früher be-

¹⁾ W. Henneberg, a. a. O. Bd. 21, S. 459 (1904).

²⁾ Münchn. medicin. Wochenschr. 1903, Nr. 45.

³⁾ Therapie der Gegenwart, 1904, März.

⁴⁾ Käufl. bei Anton Schroder, München, Landwehrstraße 45.

⁵⁾ Vgl. E. Münzer, Münchn. medicin. Wochenschrift 1903, Nr. 45.

⁶⁾ Die nähere Beschreibung der Versuchsanordnung und des verwendeten Apparates wird Herr Dr. Rudolf Rapp in der Münchn. medicin. Wochenschrift veröffentlichen.

schriebenen Verfahren¹⁾ aus beiden Präparaten Acetondauerhefe dargestellt, deren Gärkraft bei Zuckerzusatz und deren Selbstgärung ohne Zuckerzusatz in der üblichen Weise geprüft wurde.²⁾ In beiden Fällen ergaben die Acetondauerpräparate gute Gärkraft, aber nur eine äußerst geringe Selbstgärung, sodaß wir bei Versuch 1 durch eine besondere Probe mit der zehnfachen der gewöhnlichen Menge Acetondauerhefe feststellten, ob die winzige Kohlendioxydentwicklung nicht auf Gewichtschwankungen innerhalb der Fehlergrenzen zurückzuführen sind. Es ergab sich indessen hier eine deutliche, wenn auch geringe Kohlendioxydentwicklung, sodaß die Präparate nicht als glykogenfrei, wohl aber als glykogenarm angesprochen werden können. Eine vollkommene Befreiung von Glykogen ist schon dadurch ausgeschlossen, daß die aus dem Brauereibetrieb entnommene Hefe tote Zellen enthält, welche teilweise viel Glykogen aufgehäuft haben und dieses durch Lagern keineswegs verlieren. Die Menge des vorhandenen Glykogens ist aber eine so geringe, daß wir beim Aufstellen von 2 g Acetondauerhefe mit 10 ccm Wasser im Gärröhrchen keine Gasentwicklung infolge von Selbstgärung wahrnehmen konnten. Bemerkt sei noch, daß uns zur mikroskopischen Jodprobe eine halbprozentige Jodlösung (0,5 Jod, 1 g Jodkalium, 100 ccm Wasser) bessere Resultate gab, als die von W. Henneberg³⁾ verwendete $\frac{1}{10}$ ige Jodlösung. Um grobe Unterschiede im Glykogenehalt festzustellen, hat uns auch die von Henneberg⁴⁾ empfohlene makroskopische Jodfärbung gute Dienste geleistet (Tabelle I siehe nächste Seite).

Bei einem weiteren Versuche (Tab. II) wurde direkt der Glykogenehalt der frisch aus der Brauerei bezogenen Hefe verglichen mit dem Gehalte an Kohlenhydrat in einer anderen Partie derselben Hefe, die 24 Stunden im Eisschrank ausgebreitet war. Aus beiden Hefen wurde diesmal nach dem mehr-

¹⁾ R. Albert, E. Buchner u. R. Rapp, Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 35, S. 2776 (1902); E. u. H. Buchner u. M. Hahn, „Die Zymasegärung“, München 1903, 265.

²⁾ Diese und alle folgenden Versuche wurden doppelt ausgeführt, sodaß sich die Resultate gegenseitig kontrollieren.

³⁾ Wochenschrift für Brauerei, Bd. 19, S. 651 (1902).

⁴⁾ Wochenschrift für Brauerei, Bd. 21, S. 474 (1904).

Tabelle I.

Gärkraft und Selbstgärung von glykogenarmer Acetondauerhefe.

Auf 2 g Acetondauerhefe 4 bezw. 0 g Rohrzucker + 10 bezw. 100 ccm H₂O + 0.2 ccm Toluol; 22°.

Nr.	Datum	Befreiung der Hefe von Glykogen durch	Acetondauerhefe g	Rohrzuckerzusatz g	Wasserzusatz ccm	Kohlendioxyd in g nach Stunden			
						24	48	72	96
1	4. VI.	Ausbreiten	2	4	10	0.36	0.55	0.62	0.68
		20 Stunden	2	4	10	0.36	0.55	0.62	0.65
		im	2	—	10	0.01	0.01	—	—
			2	—	10	0.01	0.01	—	—
		Eisschrank	20	—	100	0.07	0.08	0.08	—
			20	—	100	0.07	0.08	0.08	—
2	9. VI.	Ausbreiten	2	4	10	0.44	0.74	0.74	0.75
		20 Stunden im	2	4	10	0.44	0.76	0.76	0.77
		Eisschrank,	2	—	10	0.01	0.01	—	—
		sodann 4 Std. bei 20°	2	—	10	0.01	0.01	—	—

fach beschriebenen Verfahren¹⁾ Preßsaft hergestellt, der aus der gelagerten Hefe auf Zuckerzusatz eine bedeutend gesteigerte Gärkraft aufwies, während die Selbstgärung und somit der Glykogengehalt auf eine sehr geringe Höhe, etwa $\frac{1}{10}$ des ursprünglichen, zurückgegangen war. Ein auffälliger Unterschied zeigte sich auch in der Opaleszenz der beiden Preßsäfte, indem der Preßsaft aus glykogenhaltiger Hefe im auffallenden Lichte ganz trüb und undurchsichtig grau erschien, wogegen der Saft aus glykogenarmer Hefe unter den gleichen Umständen merklich weniger trüb, in manchen Fällen sogar klar und durchsichtig war. Der Glykogengehalt des Saftes scheint demnach von wesentlichem Einfluß auf das Aussehen und die Klarheit des Saftes zu sein.

¹⁾ S. Monographie «Die Zymasegärung», 1903, S. 58.

Tabelle II.

Gärkraft und Selbstgärung von Preßsaft aus glykogenhaltiger und hernach vom Glykogen befreiter Hefe.

Je 20 ccm Preßsaft + 8 bzw. 0 g Rohrzucker + 0.2 ccm Toluol: 22°.

Nr.	Datum	Zur Herstellung des Preßsaftes verwendet	Rohrzucker-zusatz g	Kohlendioxyd in g nach Stunden			
				24	48	72	96
3	21. VI.	Glykogenhaltige Hefe	8	1.09	1.46	1.63	1.63
			8	1.05	1.45	1.59	1.60
			—	0.14	0.18	0.19	0.19
			—	0.14	0.18	0.19	0.19
		Glykogenarme Hefe (24 Stunden im Eisschrank ausgebreitet)	8	1.36	1.83	1.93	1.93
			8	1.38	1.85	1.99	1.99
			—	0.02	—	—	0.02
			—	0.02	—	—	0.02

Die nun folgende Gruppe von zwei Versuchen (Tab. III, Nr. 4 u. 5) sollte Aufschluß geben, ob es zweckmäßiger sei, die Befreiung von Glykogen durch Ausbreiten bei niedriger Temperatur, wobei natürlich längere Dauer des Lagerns nötig war (diesmal 2—3 Tage), oder bei 40° C. in kurzer Frist (4 Stunden), durchzuführen. Von den erhaltenen glykogenarmen Hefen wurden sodann, wie von der ursprünglichen glykogenhaltigen Hefe, Acetondauerpräparate hergestellt. Die Versuche über Selbstgärung ergaben in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der mikroskopischen Jodreaktion, daß in allen Fällen der Glykogengehalt sehr stark zurückgegangen war. Da aber die Gärkraft nach Zuckerzusatz bei den glykogenarmen Acetondauerpräparaten, die nur durch einige Stunden währendes Ausbreiten bei 40° C. vom Glykogen befreit waren, sich wesentlich besser zeigte, wurde dieses Verfahren für alle folgenden Verfahren beibehalten. Schon bei Versuch 6 (Tab. III) kam dasselbe allein zur Anwendung.

Tabelle III.

Gärkraft und Selbstgärung von Acetondauerhefe aus glykogenhaltiger und vom Glykogen durch Ausbreiten bei 2 bzw. 40° befreiter Hefe.

Je 2 g Acetondauerhefe + 4 bzw. 0 g Rohrzucker + 10 ccm Wasser + 0,2 ccm Toluol; 22°.

Nr.	Datum	Zur Herstellung der Dauerhefe verwendete Hefe	Rohrzucker-zusatz g	Kohlendioxyd in g nach Stunden			
				24	48	72	96
4	28. VI.	Glykogenhaltige Hefe	4	0,31	0,63	0,78	0,84
			4	0,31	0,63	0,79	0,84
			—	0,08	0,10	—	0,10
			—	0,08	0,08	—	0,09
		Glykogenarme Hefe (48 Stunden im Eisschrank ausgebreitet)	4	0,25	0,42	0,47	0,48
			4	0,27	0,47	0,47	0,47
			—	0,02	0,02	—	—
			—	0,02	0,02	—	—
		Glykogenarme Hefe (4 Stunden bei 40° ausgebreitet)	4	0,36	0,66	0,82	0,87
			4	0,35	0,65	0,81	0,86
			—	0,02	0,03	—	—
			—	0,00	0,00	—	—
5	7. VII.	Glykogenhaltige Hefe	4	0,34	0,61	0,69	0,71
			4	0,34	0,63	0,71	0,74
			—	0,06	—	—	0,06
			—	0,05	—	—	0,05
		Glykogenarme Hefe (72 Stunden im Eisschrank ausgebreitet)	4	0,19	0,39	0,48	0,53
			4	0,19	0,39	0,48	0,53
			—	0,01	—	—	0,01
			—	0,01	—	—	0,01
		Glykogenarme Hefe (4 Stunden bei 40° ausgebreitet)	4	0,38	0,66	0,74	0,77
			4	0,36	0,66	0,70	0,72
			—	0,01	—	—	0,01
			—	0,01	—	—	0,01
6	13. VII.	Glykogenhaltige Hefe	4	0,27	0,58	0,60	0,60
			4	0,28	0,59	0,61	0,61
			—	0,08	—	—	0,08
			—	0,10	—	—	0,10
		Glykogenarme Hefe (4 Stunden bei 40° ausgebreitet)	4	0,29	0,62	0,63	0,63
			4	0,31	0,65	0,65	0,65
			—	0,02	—	—	0,02
			—	0,01	—	—	0,01

Endlich haben wir noch zwei Versuchsreihen ausgeführt (Tab. IV), bei welchen die bisherigen Resultate durch gleichzeitige Herstellung von Preßsaft¹⁾ und von Acetondauerhefe kontrolliert wurden. Der Glykogengehalt der verwendeten Hefen war in beiden Fällen ein außerordentlich starker. Trotzdem gelang es, denselben durch 4 stündiges Ausbreiten der Hefe bei 40° C. bis auf ein sehr geringes Maß herabzudrücken, wobei die Gärkraft der glykogenarmen Präparate nach Zuckérsatz eine gute geblieben war. Erwähnt muß noch werden, daß bei der Herstellung von Preßsaft aus der glykogenarmen Hefe der Versuche 7 und 8, welche also durch 4 stündiges Ausbreiten bei 40° hergestellt war, sich der bei diesem Verfahren auftretende Wasserverlust der Hefe sehr fühlbar machte. Derselbe betrug bei Versuch 7 auf 300 g Hefe 100 g, bei Versuch 8 auf dieselbe Menge sogar 125 g. Bei der Herstellung des Preßsaftes setzten wir jeweilig das verlorene Wasser als solches vor dem Zerreiben mit Sand und Kieselgur wieder zu. Um zu sehen, ob trotz dieses Wasserzusatzes doch beim Auspressen homogener Saft erhalten wird, haben wir bei Versuch 7 die letzten 20 ccm Saft von im ganzen 150 ccm (aus 300 g Hefe) gesondert aufgefangen und ihre Gärkraft nach Zuckérsatz bestimmt: sie war nur um sehr wenig besser, als die des zuerst ausgepreßten Saftes (s. den mit * bezeichneten Versuch der Tab. IV). Eine so geringe Steigerung ist bei fraktioniert aufgefangenem Saft immer zu konstatieren, da anfangs der Saft durch Wasser aus dem Preßtuch und außen an den Hefezellen hängendes Wasser verdünnt wird.²⁾

Tabelle IV.

Gärkraft und Selbstgärung von Preßsaft und Acetondauerpräparat aus glykogenhaltiger und hernach glykogenarm gemachter Hefe.

Je 20 ccm Preßsaft + 8 bzw. 0 g Rohrzucker + 0,2 ccm

¹⁾ Um vergleichbare Zahlen zu erhalten, wurde dabei immer so gearbeitet, daß soviel Kubikzentimeter Preßsaft ausgepreßt wurden, als der Hälfte des Gewichtes der Hefe entspricht, also z. B. aus 300 g Hefe 150 ccm Saft.

²⁾ S. E. Buchner u. R. Rapp, Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 32, S. 2086 (1899); Monographie «Die Zymasegärung» 1903, S. 90.

Toluol oder 2 g Acetondauerhefe + 4 bzw. 0 g Rohrzucker + 10 ccm Wasser + 0,2 ccm Toluol; ca. 25°.

Nr.	Datum	Zur Herstellung des Präparats verwendete Hefe	Art des unter- suchten Präparats	Rohr- zucker- zusatz g	Kohlendioxyd in g nach Stunden			
					24	48	72	96
7	19. VII.	Glykogenhaltige Hefe	Preßsaft	8	0,90	1,00	1,01	1,01
				8	0,88	1,00	1,02	1,02
				—	0,23	0,27	0,28	0,28
				—	0,23	0,26	0,27	0,27
			Dauerhefe	4	0,25	0,35	0,36	0,36
				4	0,25	0,35	0,35	0,35
				—	0,13	0,14	—	0,14
				—	0,14	0,16	—	0,16
		Glykogenarme Hefe (4 Stunden bei 40° ausgebreitet)	Preßsaft	8	0,77	0,90	0,91	0,91
				8	0,75	0,90	0,92	0,92
				8	*0,54	0,90	1,00	1,00
				—	0,03	0,04	—	0,04
			Dauerhefe	—	0,03	0,04	—	0,04
				4	0,40	0,60	0,61	0,61
				4	0,42	0,61	0,62	0,62
				—	0,01	0,02	—	0,02
—	0,01	0,02	—	0,02				
8	26. VII.	Glykogenhaltige Hefe	Preßsaft	8	0,41	0,45	0,47	0,47
				8	0,41	0,45	0,46	0,46
				—	0,18	0,20	0,22	0,22
				—	0,18	0,20	0,22	0,22
			Dauerhefe	4	0,41	0,70	0,77	0,77
				4	0,42	0,71	0,80	0,80
				—	0,12	0,12	0,12	—
				—	0,11	0,12	0,13	—
		Glykogenarme Hefe (4 Stunden bei 40° ausgebreitet)	Preßsaft	8	0,54	0,73	0,76	0,78
				8	0,52	0,73	0,75	0,77
				—	0,00	0,02	—	0,02
				—	0,00	0,02	—	0,02
			Dauerhefe	4	0,43	0,68	0,78	0,79
				4	0,44	0,70	0,79	0,80
				—	0,02	0,02	—	0,02
				—	0,01	0,01	—	0,01

* Über diesen Versuch siehe oben im Text.