

Existiert ein Coenzym für die Zymase?

Von

Eduard Buchner und Wilhelm Antoni.

Aus dem chemischen Laboratorium der landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. August 1905.)

Die Herren A. Harden und W. Young¹⁾ haben vor einiger Zeit mitgeteilt, daß die Gärwirkung des Hefepreßsaftes auf Zucker durch Zusatz von aufgekochtem, selbst nicht mehr gärkräftigem Preßsaft wesentlich erhöht werden kann. Sie waren zunächst geneigt, in dem gekochten und filtrierten Saft einen Bestandteil anzunehmen, welcher den von früheren Beobachtern beschriebenen Cofermenten²⁾ ähnlich ist.

Die Wirkung des Zusatzes von erwärmtem, selbst nicht mehr gärkräftigem Preßsaft zu gärendem Hefesaft hat der Eine von uns schon früher, allerdings in nur zwei Fällen, untersucht:³⁾ es ergab sich dabei kein auffallendes Resultat, während nach den englischen Autoren die Gesamtgärkraft von Preßsaft bei Zusatz von 1 Vol. gekochtem Saft verdoppelt, bei Zusatz von 3—5 Vol. noch mehr erhöht wird.

Eine Steigerung der Gärkraft des Preßsaftes innerhalb der ersten 16 Stunden ungefähr auf das Doppelte kann nach den Versuchen des Einen von uns durch Zusatz von 2^o/_o Arsen-trioxyd, gelöst in überschüssiger Pottasche, oder auch durch Zusatz von 0,6^o/_o Pottasche allein erreicht werden:⁴⁾ in beiden

¹⁾ The journal of physiology, Bd. XXXII, Nr. 1. Proceed. of the physiol. Soc. Nov. 1904.

²⁾ Vgl. z. B. Magnus, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 152 (1904).

³⁾ Buchner u. Rapp. Ber. der Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXII, S. 2093 (1899), Nr. 258 u. 265; E. u. H. Buchner u. M. Hahn, Die Zymasegärung, 1903, München und Berlin, S. 200, Nr. 536 u. 543.

⁴⁾ Die Zymasegärung, S. 187, Nr. 462; S. 141, Nr. 267.

Fällen wird aber die Gesamtgärkraft nicht erhöht, weil die Zusätze ein rascheres Erlöschen der Gärwirkung bedingen. Setzt man dagegen zu Preßsaft sekundäres Natriumphosphat,¹⁾ so wird die Gärwirkung innerhalb des ersten Tages unter Umständen auf das Doppelte und auch die Gesamtwirkung nach 4 Tagen auf das $1\frac{1}{3}$ fache gesteigert.

In einer weiteren Mitteilung haben die Herren Harden und Young²⁾ selbst auf die große Bedeutung des Zusatzes von Alkaliphosphaten für die Gärwirkung des Saftes hingewiesen.

Die Frage war nun, wie weit die Gegenwart von Phosphaten in dem aufgekochten Hefepreßsaft den wir kurz als Kochsaft bezeichnen wollen, die auffälligen Beobachtungen der Herren Harden und Young erklärt. Die beiden Forscher scheinen ferner bei ihren Versuchen zwei, unserer Meinung nach, wichtige Punkte, welche den Verlauf der zellfreien Gärung stark beeinflussen, außer Acht gelassen zu haben. Durch Zusatz von 2—5 Vol. Kochsaft ohne Vermehrung der Zuckermenge wurde schrittweise eine Verminderung der Zuckerkonzentration herbeigeführt: eine solche beschleunigt aber für den Anfang nach den Versuchen des Einen³⁾ von uns den Verlauf der Gärung. Andererseits ist es der Versuchsanordnung eigentümlich, daß am Schlusse der Versuche mit steigender Verdünnung durch Kochsaft eine Abnahme der Alkoholkonzentration auftritt, was für die Beendigung des Gärungsvorganges und das Unwirksamwerden der Zymase von entscheidender Bedeutung sein dürfte.⁴⁾

Bei dem außerordentlich großen Interesse, welches der eventuelle Nachweis eines Coenzymes für die Zymase verdient, haben wir es als wünschenswert erachtet, die Versuche der Herren Harden und Young mit Preßsaft anderen Ursprunges, nämlich aus untergäriger Berliner Bierhefe zu wiederholen

¹⁾ A. Wroblewski, Journal f. prakt. Chemie [2], Bd. LXIV, S. 11 (1901); Buchner u. Hahn, Die Zymasegärung, S. 141, Nr. 277 u. 281.

²⁾ Proceed. Chem. Soc., Bd. XXI, Nr. 297, S. 189 (1905).

³⁾ Die Zymasegärung, S. 153, Nr. 325—331.

⁴⁾ Anhäufung der Spaltungsprodukte schädigt alle Enzymwirkungen, was wir für Äthylalkohol bei der zellfreien Gärung noch besonders bewiesen haben. (Buchner u. Antoni, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 225, 1905.)

und gleichzeitig zu prüfen, wie weit die oben erwähnten, in der Versuchsanordnung begründeten Mängel, die Änderung der Zuckerkonzentration und des Alkoholgehaltes, die Resultate zu beeinflussen vermögen.

Zunächst wurde in völliger Übereinstimmung mit den Angaben der englischen Forscher festgestellt, daß beim Verdünnen von Preßsaft mit 1—8 Vol. Kochsaft bei Zusatz der gleichen Zuckermenge eine Steigerung der Gärkraft am ersten Tage bis auf das Doppelte, nach 4—7 Tagen Gärdauer als Gesamtwirkung auf das 3—5fache eintritt. Mit der Menge des zugesetzten Kochsaftes steigt auch die Dauer der Gärwirkung, es bleibt also die Zymase länger wirksam. Das Maß der Steigerung, sowohl der Anfangsgärung wie der Gesamtgärkraft, hängt, wie uns mehrere Versuche bewiesen haben, wesentlich von der Gärkraft des Preßsaftes ab, sodaß schlechte Preßsäfte mit geringer Gärwirkung durch Kochsaftzusatz sehr stark, von vornherein sehr gärkräftige Preßsäfte dagegen nicht so erheblich in ihrer Wirkung gesteigert werden. Die von den Herren Harden und Young beobachtete große Steigerung der Gärwirkung wird wohl mit der geringen Aktivität, wie sie für die Preßsäfte aus englischer Bierhefe charakteristisch ist, zusammenhängen.

Zur Darstellung des Kochsaftes haben wir für gewöhnlich den frischen Preßsaft im Wasserbade bis zum Koagulieren erhitzt, filtriert, dann kurz aufgeköcht und nochmals filtriert. In Übereinstimmung mit den Angaben der englischen Forscher kann, wie wir uns in einer Reihe von Versuchen überzeugten, der Kochsaft, ohne seine Wirkung einzubüßen, im Vacuum eingedampft, mit Aceton gefällt, dann direkt durch Erhitzen von abgepreßter Hefe mit 70% Wassergehalt, also ohne vorherige Darstellung von Preßsaft, endlich durch Ausziehen von Acetondauerhefe mit Wasser gewonnen werden.

Die Herren Harden und Young haben ihre Versuche mit Glukose ausgeführt, während wir Rohrzucker benutzten. Wir haben uns deshalb noch besonders davon überzeugt, daß die zellfreie Gärung der beiden Kohlenhydrate durch Kochsaft in gleicher Weise beeinflußt wird.

Eine Versuchsreihe, bei welcher bei steigenden Kochsaftzusätzen auch entsprechend die Zuckerzugabe gesteigert wurde, sodaß immer konstante Zuckerkonzentration vorhanden war, ergab, wie es nach den obigen Ausführungen als wahrscheinlich zu betrachten war, keine so starke Zunahme der Gärkraft bei steigendem Zusatz an Kochsaft, wie bei den Versuchen nach Harden und Young, nämlich am ersten Tage nur auf das $1\frac{1}{2}$ fache und eine Steigerung der Gesamtwirkung auf das $2\frac{1}{2}$ fache. Ähnlich verlief eine zweite Versuchsreihe, bei welcher Verdünnungen mit Kochsaft bei konstanter und bei variabler Zuckerkonzentration direkt mit einander verglichen wurden. Bei allen diesen Versuchen ist jedoch der zweite, die Resultate beeinflussende Faktor, nämlich die Abnahme des Alkoholgehaltes am Schlusse mit steigendem Kochsaftzusatz, noch nicht ausgeschaltet.

In zwei Versuchsreihen wurde dann geprüft, ob sich die Wirkung von Kochsaftzusätzen vielleicht direkt durch Zugabe von Natriumphosphatlösungen ersetzen läßt. In der Tat ergab sich unter Umständen eine stärkere Wirkung der Natriumphosphatlösungen als die von Kochsaft.

Um festzustellen, ob dabei speziell der Phosphorsäuregehalt eine gewisse Rolle spielt, haben wir bei andern Versuchen Lecithin zugesetzt, und auch damit eine beträchtliche Steigerung der Gärwirkung erreicht. Während der Eine von uns die Wirkung des Natriumphosphats früher¹⁾ nur in der alkalischen Reaktion des letzteren suchen zu müssen glaubte, scheint es nunmehr wahrscheinlich, daß der Phosphorsäure eine spezifische Rolle bei der Zymasegärung zufällt. Es ist das besondere Verdienst der Herren Harden und Young, darauf aufmerksam gemacht zu haben. Die Gegenwart von Phosphorsäure im Kochsaft und die mit steigendem Kochsaftzusatz sinkende Zucker- und Alkoholkonzentration sind wohl hauptsächlich die Ursache der Wirkung des Kochsaftes.

Da Lecithinzusatz einen großen Einfluß gezeigt hat, da andererseits nach ein paar Versuchen von uns 4 Stunden auf 130° erhitzter Kochsaft, sowie der Glührückstand von Hefe

¹⁾ Die Zymasegärung, S. 140.

oder geringe Mengen von freier Phosphorsäure nur schwache bzw. keine verstärkende Wirkung ausübten, kommen als wirksames Prinzip auch organische Phosphorsäureverbindungen in Betracht. Nach Harden und Young läßt sich dem Preßsaft zugesetztes Alkaliphosphat nach der Gärung nicht mehr durch Magnesiamischung fällen, was auch auf die Bildung einer organischen Phosphorsäureverbindung im Preßsaft hinweist. Ob man eine solche verhältnismäßig einfache Substanz, welche z. B. dem Lecithin, das reichlich in der Hefe vorkommt, nahe stehen könnte, zweckmäßig als Coenzym bezeichnet, ist sehr fraglich; auch die Herren Harden und Young erwähnen in ihrer zweiten Mitteilung diese Bezeichnung nicht mehr.

Schließlich haben wir noch den Einfluß verschiedener bis jetzt nicht geprüfter Stoffe auf die zellfreie Gärung untersucht. Bei der Fettspaltung durch Lipase aus Rizinussamen wird als sogenannter «Aktivator» mit Vorteil eine geringe Menge Manganosulfat zugesetzt.¹⁾ Obwohl es nicht ersichtlich ist, wie der Zusatz dieses Stoffes von Vorteil sein soll, haben wir doch einige Versuche damit angestellt und außerdem Aluminiumsulfat, Ferrosulfat und Kobaltosulfat geprüft, aber ohne Erfolg.

Nach interessanten Versuchen von H. Lange²⁾ gelingt es ferner, die Gärwirkung des Hefepreßsaftes bis auf das 9fache zu steigern, wenn man die Hefe vor der Zerreibung in unter anderem mit Asparagin versetzten Rohrzuckerlösungen lagern läßt. Diese Beobachtung konnte entweder auf eine Anregung zur Zymasebildung oder auf eine Verstärkung der Wirkung der vorhandenen Zymase zurückzuführen sein. Wir haben deshalb geprüft, ob die zellfreie Gärung durch Zusatz von Asparagin, Glycocoll, Harnstoff, Guanin, Pepton und verschiedenen Albumosen gefördert wird. Nur bei Zusatz von 0,6% Harnstoff bzw. Glycocoll wurde eine kleine kaum nennenswerte Erhöhung konstatiert. Das Asparagin muß demnach die Zymasebildung in den lebenden Zellen begünstigen.

¹⁾ E. Hoyer, «Der Seifenfabrikant», 1905, Nr. 27.

²⁾ Jahrbuch der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin, Bd. VII, S. 43 (1904).

Die Beobachtung von Harden und Young über den Einfluß der Gegenwart von Phosphorsäureverbindungen auf die Zymasegärung ließ es wahrscheinlich erscheinen, daß einige unserer früheren Versuche durch den Mangel an derartigen Stoffen wesentlich beeinflusst worden waren. So hatten Dialyseversuche ergeben,¹⁾ daß der Preßsaft im Gürberschen Apparat bei 0° gegen Wasser dialysiert nach 48 Stunden seine Gärkraft verloren hat. Nach den Angaben der englischen Forscher läßt sich der Preßsaft mit Hilfe von Martins Gelatinefilter in einen Rückstand und ein Filtrat trennen, die beide für sich nicht gärkräftig sind, wohl aber vereinigt Zucker vergären. Auch bei unseren Versuchen konnte demnach der Mangel an dem diffundierten Bestandteil die Ursache des Unwirksamwerdens vorstellen. Tatsächlich ergab sich, daß ein durch Dialyse fast wirkungslos gewordener Saft durch Zufügen des eingedampften Dialysates oder von Kochsaft, wie gewöhnlich hergestellt, wieder wirksam wird.

Trägt man Preßsaft in Aceton ein, so ist nach ausführlichen Versuchen²⁾ die zehnfache Menge des Fällungsmittels notwendig, um im Niederschlage die ganze Gärkraft wieder zu erhalten. Bei Anwendung geringerer Mengen geht viel von der Gärkraft verloren, obwohl die Ausbeute an Niederschlag keine große Einbuße aufweist. Auch hier konnte man vermuten, daß es bei Anwendung geringerer Acetonmengen in der Fällung an den nötigen Phosphorsäureverbindungen mangelt, wie sie die Wirkung des Kochsaftes bedingen. In Übereinstimmung mit dieser Annahme haben zwei Versuchsreihen ergeben, daß die Gärwirkung der Acetonfällungen durch Zusatz von Kochsaft wesentlich gesteigert wird: im zweiten Versuche ist es sogar gelungen, nachzuweisen, daß durch Zusatz von Kochsaft die Gärkraft der Fällung durch 1 Vol. Aceton auf nahezu das 3fache, die Gärkraft der Fällung durch 10 Vol. Aceton dagegen nur auf das 2 $\frac{1}{2}$ fache gesteigert wird. Der Salzgehalt des Niederschlages

¹⁾ Buchner u. Antoni, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 210 (1905).

²⁾ Die Zymasegärung, 1903, Seite 244 ff. J. Meisenheimer, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 521 (1903).

steigt mit der Menge des angewandten Fällungsmittels. Wir haben z. B. aus einem Preßsaft bei fraktionierter Fällung durch schrittweisen Zusatz von $\frac{1}{2}$, 1 und 3 Vol. Aceton Niederschläge erzielt, die 10,7, bzw. 12,1, bzw. 20,3% Glührückstand hinterließen.

Experimentelles.

Die Anordnung der in den folgenden Tabellen enthaltenen Versuche war durchgehends die, daß in zwei Erlenmeyer-Kölbchen mit Meisslschem Gärverschluß (Nr. 1 und 2 der Versuche) die Gärkraft von 10 bzw. 20 ccm Preßsaft bestimmt wurde zur Kontrolle der übrigen, bei denen die verschiedenen Zusätze gemacht wurden. Der benutzte Kochsaft selbst wurde anfangs (Tabelle I und IV) auch auf seine Gärkraft untersucht, später aber konnte davon Abstand genommen werden, da er sich niemals als wirksam erwies. Tabelle I (S. 143 u. 144) zeigt nur Versuche mit Zusatz von Kochsaft. Während die Versuchsreihen I und II den Einfluß des Kochsaftes auf mäßig gärkräftigen Preßsaft wiedergeben, ist die Versuchsreihe III mit sehr gärkräftigem Preßsaft ausgeführt, bei welchem, wie oben erwähnt, die relative Wirkung des Kochsaftes am schwächsten ist. Die beiden letzten Spalten enthalten den berechneten Zuckergehalt bei Beginn der Versuche und den aus der Kohlendioxydentwicklung unter Berücksichtigung der Löslichkeit dieses Gases berechneten Alkoholgehalt am Ende der Versuche. Der Zuckergehalt sinkt regelmäßig mit dem Kochsaftzusatz, ebenso schrittweise, abgesehen von kleinen Ausnahmen, die Menge des bei der Gärung entstandenen Alkohols.

Tabelle II (S. 145) zeigt zunächst Versuche zur Anreicherung des Kochsaftes an den wirksamen Bestandteilen durch Konzentrieren der Lösung im Vacuum bei etwa 55° , bis er $\frac{1}{10}$ Vol. erreicht und der Rückstand eine sirupartige Konsistenz angenommen hatte. Derselbe wurde dann unverdünnt (Nr. 5 u. 6) oder mit 9 Vol. Wasser verdünnt (Nr. 7 u. 8) zum Preßsaft gesetzt. Die Zahlen beweisen, daß der Kochsaft durch das Eindampfen nicht geschädigt worden ist. Der konzentrierte Saft (Nr. 5 u. 6) besaß natürlich eine erhöhte Wirkung.

Tabelle I.

Gärwirkung von Preßsaft bei Zusatz von Kochsaft.

Je 10 ccm Preßsaft + wechselnde Mengen Kochsaft + 4 g Rohrzucker
+ 0.2 ccm Toluol. 22°.

Ver- suchs- reihe	Nr.	Preß- saft ccm	Koch- saft ccm	Kohlendioxyd in Grammen nach Tagen						Zucker- gehalt bei Be- ginn des Ver- suches %	Alkohol- gehalt am Ende des Ver- suches %
				1	2	3	4	5	7		
I	1	10	0	0,17	0,28	0,28	0,28	—	—	28	2,2
	2	10	0	0,20	0,32	0,32	0,32	—	—	28	2,2
	3	10	10	0,26	0,56	0,67	0,67	—	—	16	2,9
	4	10	10	0,26	0,57	0,67	0,67	—	—	16	2,9
	5	10	20	0,30	0,68	0,86	0,86	—	—	11	2,6
	6	10	20	0,27	0,64	0,80	0,80	—	—	11	2,6
	7	10	30	0,30	0,73	0,94	1,22	—	—	9	2,9
	8	10	30	0,32	0,73	0,95	1,24	—	—	9	2,9
	9	10	40	0,30	0,74	0,96	1,33	—	—	7	2,6
	10	10	40	0,29	0,72	0,97	1,38	—	—	7	2,6
	11	10	50	0,33	0,76	1,02	1,43	—	—	6	2,4
	12	10	50	0,32	0,73	1,00	1,42	—	—	6	2,4
	13	10	60	0,30	0,77	1,02	1,42	—	—	5	2,1
	14	10	60	0,32	0,76	1,01	1,43	—	—	5	2,1
	15	0	10	0,00	—	—	0,00	—	—	—	—
	16	0	10	0,00	—	—	0,00	—	—	—	—

(Fortsetzung s. S. 144).

Tabelle I (Fortsetzung zu S. 143).

Gärwirkung von Preßsaft bei Zusatz von Kochsaft.

Je 10 ccm Preßsaft + wechselnde Mengen Kochsaft + 4 g Rohrzucker
+ 0.2 ccm Toluol. 22°.

Ver- suchs- reihe	Nr.	Preß- saft ccm	Koch- saft ccm	Kohlendioxyd in Grammen nach Tagen						Zucker- gehalt bei Be- ginn des Ver- suches %	Alkohol- gehalt am Ende des Ver- suches %
				1	2	3	4	5	7		
II	1	10	0	0.14	0.30	0.40	0.43	0.44	0.44	28	3.3
	2	10	0	0.13	0.29	0.39	0.43	0.45	0.45	28	3.3
	3	10	10	0.20	0.40	0.59	0.72	0.79	0.86	16	3.8
	4	10	10	0.19	0.44	0.63	0.74	0.80	0.87	16	3.8
	5	10	20	0.19	0.47	0.72	0.90	0.99	1.15	11	3.6
	6	10	20	0.23	0.53	0.77	0.95	1.05	1.20	11	3.6
	7	10	30	0.22	0.53	0.77	0.99	1.10	1.36	9	3.2
	8	10	30	0.23	0.51	0.76	0.96	1.06	1.31	9	3.2
	9	10	40	0.25	0.56	0.84	1.09	1.24	1.54	7	3.0
	10	10	40	0.23	0.52	0.81	1.04	1.20	1.52	7	3.0
	11	0	10	0.00	—	—	—	—	0.00	—	—
	12	0	10	0.00	—	—	—	—	0.00	—	—
III	1	10	0	0.42	0.53	—	0.57	0.57	0.57	28	4.2
	2	10	0	0.39	0.51	—	0.54	0.54	0.54	28	4.2
	3	10	10	0.59	0.90	—	1.14	1.15	1.15	16	5.0
	4	10	10	0.59	0.90	—	1.15	1.16	1.16	16	5.0
	5	10	30	0.68	1.13	—	1.46	1.51	1.57	9	3.7
	6	10	30	0.68	1.11	—	1.45	1.50	1.56	9	3.7
	7	10	60	0.78	1.08	—	1.47	1.50	1.53	5	2.2
	8	10	60	0.79	1.13	—	1.43	1.50	1.57	5	2.2
	9	10	80	0.75	1.06	—	1.38	1.46	1.69	4	2.0
	10	10	80	0.70	1.05	—	1.36	1.46	1.75	4	2.0
	11	0	10	0.00	—	—	—	—	0.00	—	—
	12	0	10	0.00	—	—	—	—	0.00	—	—

Tabelle II.

Preßsaft mit Zusatz von verschieden behandeltem Kochsaft.

Je 10 bzw. 20 ccm Preßsaft + wechselnde Mengen Kochsaft + 4 g Rohrzucker auf 10 ccm Preßsaft bzw. 8 g auf 20 ccm + 0,2 ccm Toluol. 22°.

Ver- suchs- reihe	Nr.	Preß- saft ccm	Koch- saft ccm	Darstellung des Kochsaftes	Kohlendioxyd in Grammen nach Tagen					
					1	2	3	4	6	7
I	1	10	0	—	0,26	0,44	—	0,46	—	—
	2	10	0		0,26	0,44	—	0,47	—	—
	3	10	10	Darstellung wie ge- wöhnlich	0,30	0,56	—	0,75	—	—
	4	10	10		0,32	0,56	—	0,73	—	—
	5	10	10	Eingedampft (im Vac.) auf $\frac{1}{10}$ Vol.	0,38	0,68	—	1,17	1,40	1,43
	6	10	10		0,36	0,67	—	1,13	1,37	1,43
	7	10	1	Wie 5 und 6, dann 9 ccm H_2O wieder zu- gesetzt	0,34	0,59	—	0,76	—	—
	8	10	1		0,34	0,59	—	0,76	—	—
II	1	20	0	Preßsaft zum Ver- gleiche verdünnt mit je 20 ccm H_2O	0,41	—	0,45	—	—	—
	2	20	0		0,39	—	0,41	—	—	—
	3	20	20	Im Vacuum einge- dampfter Kochsaft	0,95	—	1,72	1,79	—	—
	4	20	20		0,94	—	1,68	1,78	—	—
	5	20	—	1 g Acetonfällung A des Kochsaftes gelöst in 20 ccm H_2O	0,79	—	1,16	—	—	—
	6	20	—	1 g Acetonfällung B des Kochsaftes gelöst in 20 ccm H_2O	0,79	—	1,00	—	—	—
III	1	20	0	Preßsaft zum Ver- gleiche verd. mit je 20 ccm H_2O	0,77	0,82	0,84	—	—	—
	2	20	0		0,75	0,81	0,83	—	—	—
	3	20	20	Kochsaft A: Hefe mit Wasser erhitzt	1,20	2,25	2,63	2,79	3,10	3,20
	4	20	20		1,17	2,18	2,63	2,79	3,12	3,24
	5	20	20	Kochsaft B: Hefe für sich erhitzt	0,95	1,94	2,52	2,72	3,02	3,14
	6	20	20		0,88	1,99	2,61	2,80	3,11	3,21
	7	20	20	Kochsaft C: Dauer- hefe mit Wasser er- hitzt	1,01	1,91	2,36	2,70	3,00	3,04
	8	20	20		1,06	1,95	2,41	2,69	3,00	3,06

Versuchsreihe II (Tab. II) zeigt, daß man die wirksamen Bestandteile des Kochsaftes mit Aceton ausfällen kann. Von einem im Vacuum etwas eingedampften Kochsaft (Nr. 3 u. 4) wurde erstens 1 Raumteil mit 2 Raumteilen Aceton gefällt, der Niederschlag zweimal mit absolutem Alkohol angerührt, auf der Nutsche abgesaugt und mit absolutem Äther gewaschen: Fällung A. Zweitens wurde dieselbe Menge Kochsaft mit 10 Teilen Aceton gefällt und dann wie oben behandelt: Fällung B. Beide Niederschläge zeigen nun in 20 ccm Wasser gelöst, zum Preßsaft hinzugefügt, eine starke ungefähr gleiche Erhöhung seiner Gärwirkung (Nr. 5 u. 6).

Die dritte Versuchsreihe (Tab. II) endlich ergibt, daß die Darstellung des Kochsaftes abgeändert und vereinfacht werden kann. Es ist nicht nötig, die Hefe erst zu zerreiben und Preßsaft herzustellen, sondern durch Aufkochen der Hefe mit etwa derselben Menge Wasser und Filtrieren erhält man direkt ein sehr wirksames Produkt (Kochsaft A Nr. 3 u. 4). Ja man kann sogar durch Erhitzen abgepreßter Hefe ohne Wasser auf einfachste Weise zum Ziele kommen. Die auf etwa 70% Wassergehalt abgepreßte Hefe wird direkt im Wasserbade auf 100° erhitzt: nach $\frac{1}{2}$ —1 Stunde ist die ganze Masse ein dünnflüssiger Brei. Vermittelst der hydraulischen Presse werden so aus 1 kg Hefe bequem 500 ccm Saft erhalten, der noch kurz aufzukochen und zu filtrieren ist (Kochsaft B, Nr. 5 u. 6).

Tabelle III (S. 147) zeigt, daß der Kochsaftzusatz den gleichen Einfluß besitzt, ob man Glukose oder Saccharose als Gärmaterial benutzt. Bei letzterem Kohlenhydrat (Nr. 7—12) ist merkwürdigerweise die Angärung etwas schneller als bei Traubenzucker. Die Unterschiede bei den Schlußresultaten liegen innerhalb der Fehlergrenzen.

Tabelle IV (S. 148) enthält zwei Versuche mit Kochsaftzusatz unter Erhöhung der Zuckerzugabe bis zu konstanter Konzentration, deren zweitem zum Vergleiche noch Versuche mit gleichem Zuckerzusatz, also mit der Menge des Kochsaftes sinkender Zuckerkonzentration zugefügt sind. Die Resultate wurden bereits im allgemeinen Teil besprochen. Es sei nur noch darauf hingewiesen, daß sich in den beiden letzten Spalten wieder die

Zuckerkonzentration am Anfang und der berechnete Alkoholgehalt am Schluß der Versuche beigefügt finden.

Tabelle III.

Kochsaftzusatz bei zellfreier Glukose- bzw. Saccharosegärung.

Je 20 ccm Preßsaft + 8 g Glukose bzw. 8 g Rohrzucker + Kochsaft + 0.2 ccm Toluol. 22°.

Nr.	Preßsaft ccm	Glukose g	Rohrzucker g	Kochsaft ccm	Kohlendioxyd in Grammen nach Tagen						
					1	2	3	4	5	6	7
1	20	8	0	0	0,52	1,00	1,24	1,42	1,47	1,50	1,50
2	20	8	0	0	0,48	0,97	1,19	1,39	1,44	1,46	1,46
3	20	8	0	20	0,55	1,30	1,81	2,22	2,49	2,59	2,71
4	20	8	0	20	0,56	1,28	1,76	2,15	2,41	2,55	2,70
5	20	8	0	40	0,62	1,39	1,74	2,10	2,29	2,48	2,54
6	20	8	0	40	0,57	1,31	1,67	2,06	2,21	2,41	2,50
7	20	0	8	0	0,57	1,07	1,22	1,34	1,38	1,40	1,40
8	20	0	8	0	0,58	1,10	1,28	1,41	1,44	1,47	1,47
9	20	0	8	20	0,67	1,47	1,87	2,23	2,42	2,52	2,67
10	20	0	8	20	0,66	1,45	1,85	2,19	2,39	2,50	2,65
11	20	0	8	40	0,54	1,34	1,74	2,10	2,34	2,45	2,57
12	20	0	8	40	0,59	1,41	1,81	2,12	2,36	2,47	2,56

Tabelle V (S. 149) gibt zunächst einen vergleichenden Versuch über die Wirkung von Natriumphosphat und Kochsaft, bei welchem ein Zusatz von 6 g Natriumphosphat in 40 ccm Wasser gelöst, sowohl die Gärung innerhalb des ersten Tages als die Gesamtgärung nach 5 Tagen stärker erhöht hat als der Zusatz von 40 ccm (2 Vol.) Kochsaft. Die zweite Versuchsreihe enthält einige Versuche, bei welchen außer Natriumphosphat auch noch Lecithin zugesetzt wurde. Letzterer Körper erhöht für sich die Gärwirkung des Preßsaftes deutlich (besonders stark bei schwach gärkräftigem Saft und gleichzeitigem Wasserzusatz, siehe Tabelle VI) und bringt auch, wenn bereits Natriumphosphat zugesetzt ist, noch eine geringe weitere Steigerung zustande. Die bei diesen Versuchen verwendeten Kochsäfte wurden durch Erhitzen des Hefepreßsaftes desselben Versuches hergestellt.

Tabelle IV.

Kochsaftzusatz bei konstanter bzw. variabler Zucker-
konzentration.

Je 10 ccm Presssaft + wechselnde Mengen Kochsaft + wechselnde
Mengen Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol. 22°.

Ver- suchs- reihe	Nr.	Preß- saft ccm	Koch- saft ccm	Rohr- zucker g	Kohlendioxyd in Grammen nach Tagen						Zucker- gehalt bei Be- ginn des Ver- suches %	Alkohol- gehalt am Ende des Ver- suches %
					1	2	3	4	5	6		
I	1	10	0	4	0,33	0,63	0,73	0,73	—	—	28	5,4
	2	10	0	4	0,33	0,61	0,70	0,70	—	—	28	5,4
	3	10	10	8	0,41	0,93	1,21	1,30	—	—	28	4,5
	4	10	10	8	0,40	0,92	1,20	1,29	—	—	28	4,5
	5	10	25	14	0,41	0,98	1,39	1,60	—	—	28	2,9
	6	10	25	14	0,41	0,95	1,36	1,56	—	—	28	2,9
	7	10	40	20	0,49	1,09	1,58	1,83	—	—	28	2,3
	8	10	40	20	0,47	1,04	1,53	1,80	—	—	28	2,3
	9	0	10	4	0,00	—	—	0,00	—	—	—	—
	10	0	10	4	0,00	—	—	0,00	—	—	—	—
II	1	10	0	4	0,40	0,44	—	0,44	—	—	28	3,4
	2	10	0	4	0,42	0,45	—	0,45	—	—	28	3,4
	3	10	10	8	0,45	0,66	—	0,71	0,71	—	28	2,7
	4	10	10	8	0,49	0,68	—	0,71	0,71	—	28	2,7
	5	10	25	14	0,49	0,77	—	0,93	0,94	—	28	2,0
	6	10	25	14	0,50	0,77	—	0,93	0,94	—	28	2,0
	7	10	40	20	0,52	0,83	—	1,08	1,12	1,13	28	1,7
	8	10	40	20	0,51	0,82	—	1,07	1,11	1,13	28	1,7
	9	10	70	32	0,58	0,92	—	1,31	1,39	1,40	28	1,4
	10	10	70	32	0,55	0,90	—	1,33	1,40	1,42	28	1,4
	11	10	10	4	0,59	0,74	—	0,75	0,75	—	16	3,1
	12	10	10	4	0,50	0,65	—	0,67	0,67	—	16	3,1
	13	10	25	4	0,60	0,85	—	0,92	0,94	—	10	2,4
	14	10	25	4	0,59	0,81	—	0,89	0,90	—	10	2,4
	15	10	40	4	0,70	1,08	—	1,23	1,27	1,30	7	2,5
	16	10	40	4	0,72	1,05	—	1,20	1,23	1,28	7	2,5
	17	10	70	4	0,75	1,09	—	1,25	1,33	1,37	5	1,8
	18	10	70	4	0,78	1,12	—	1,32	1,37	1,41	5	1,8
	19	0	10	4	0,00	—	—	—	—	0,00	—	—
	20	0	10	4	0,00	—	—	—	—	0,00	—	—

Tabelle V.

Wirkung von Natriumphosphat im Vergleich mit Kochsaft
bezw. Lecithin.Je 20 ccm Prefsaft + 8 g Rohrzucker + sekundäres Natriumphosphat
bezw. Kochsaft bezw. Lecithin + 0,2 ccm Toluol. 22°.

Ver- suchs- reihe	Nr.	Pref- saft ccm	Natrium- phosphat g	Koch- saft ccm	Leci- thin g	Wasser ccm	Kohlendioxyd in Grammen nach Tagen					
							1	2	3	4	5	6
I	1	20	0	0	0	0	0,54	1,14	1,46	1,61	1,69	—
	2	20	0	0	0	0	0,54	1,12	1,42	1,56	1,65	—
	3	20	2	0	0	0	0,92	1,55	1,75	1,95	2,05	—
	4	20	2	0	0	0	0,89	1,49	1,72	1,90	2,00	—
	5	20	4	0	0	20	0,95	1,61	1,90	2,12	2,32	—
	6	20	4	0	0	20	0,96	1,61	1,89	2,10	2,29	—
	7	20	6	0	0	40	1,03	1,60	1,88	2,10	2,25	—
	8	20	6	0	0	40	1,03	1,64	1,90	2,13	2,28	—
	9	20	0	20	0	0	0,60	1,30	1,70	1,92	2,08	—
	10	20	0	20	0	0	0,59	1,29	1,69	1,92	2,06	—
	11	20	0	40	0	0	0,59	1,22	1,55	1,70	1,82	—
	12	20	0	40	0	0	0,56	1,23	1,57	1,70	1,80	—
II	1	20	0	0	0	0	0,57	1,07	1,22	1,34	1,38	1,40
	2	20	0	0	0	0	0,58	1,10	1,28	1,41	1,44	1,47
	3	20	2	0	0	0	1,01	1,53	1,76	1,90	1,94	1,97
	4	20	2	0	0	0	1,03	1,59	1,82	1,97	1,99	2,03
	5	20	6	0	0	40	1,35	1,95	2,24	2,43	2,53	2,60
	6	20	6	0	0	40	1,34	1,96	2,26	2,46	2,57	2,62
	7	20	0	40	0	0	0,66	1,20	1,35	1,42	1,47	1,49
	8	20	0	40	0	0	0,66	1,24	1,40	1,47	1,53	1,56
	9	20	0	0	0,5	0	0,63	1,20	1,40	1,58	1,61	1,63
	10	20	0	0	0,5	0	0,64	1,16	1,35	1,51	1,53	1,57
	11	20	2	0	0,5	0	1,07	1,68	1,93	2,13	2,19	2,21
	12	20	2	0	0,5	0	1,02	1,64	1,90	2,09	2,15	2,18
	13	20	6	0	0,5	40	1,40	1,99	2,26	2,50	2,68	2,71
	14	20	6	0	0,5	40	1,37	1,98	2,23	2,50	2,67	2,70

Zur Entscheidung, ob die Wirkung des Natriumphosphates wesentlich auf den basischen Bestandteil oder die Säuregruppe zurückzuführen ist, dienten die in Tabelle VI (s. u.) mitgeteilten Versuche mit Zusatz von Lecithin. Es zeigte sich, daß dieser Körper,¹⁾ den wir unter Anreiben mit einem Glasstabe möglichst als Emulsion und unter Verdünnung des Preßsaftes mit Wasser zugesetzt haben, bei dem vorliegenden schwach wirksamen Saft eine geringe Erhöhung der Gärkraft innerhalb des ersten Tages, jedoch eine Steigerung der Gesamtgärwirkung auf mehr als das Dreifache unter wesentlicher Verlängerung der Gärdauer herbeiführte.

Tabelle VI.

Gärwirkung von Preßsaft bei Zusatz von Lecithin.

Je 20 ccm Preßsaft + 8 g Rohrzucker + Lecithin + 20 ccm Wasser
+ 0,2 ccm Toluol. 22°.

Nr.	Preßsaft ccm	Lecithin g	Wasser ccm	Kohlendioxyd in Grammen nach Tagen					
				1	2	3	4	5	6
1	20	0	0	0,54	0,63	0,64	—	—	—
2	20	0	0	0,55	0,65	0,65	—	—	—
3	20	0,5	20	0,60	1,07	1,31	1,46	1,55	1,56
4	20	0,5	20	0,64	1,08	1,29	1,41	1,47	1,49
5	20	2,0	20	0,65	1,16	1,39	1,56	1,65	1,67
6	20	2,0	20	0,63	1,16	1,44	1,61	1,71	1,72

Tabelle VII (S. 151) berichtet über den Einfluß des Zusatzes von einigen Metallsulfaten, welche in den angewandten Verdünnungen keine oder nur schädliche Einwirkung zeigten.

Tabelle VIII (S. 152) gibt eine Anzahl von Versuchen mit Zusatz verschiedener organischer Stoffe, einfacherer und komplizierterer Art, wieder. Eine Erhöhung der Gärkraft trat nur bei Zusatz von 0,6% Harnstoff bzw. Glycocoll ein; schädlich wirkten direkt Antipepton, Hemialbumose und Protalbumose, die wir von G. Grübler in Dresden-Plauen bezogen und, weil die wässrige Lösung sauer reagierte, mit ein paar Tropfen Sodaauslösung neutralisiert hatten. Das derselben Quelle entstammende gleichfalls sauer reagierende Syntonin war ohne jede Wirkung.

¹⁾ Bezogen von E. Merck, Darmstadt.

Tabelle VII.

Prefsaft und Manganosulfat, sowie andere anorganische Salze.

Je 20 ccm Prefsaft + gepulverte bzw. gelöste Salze + 8 g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol. 22°.

Versuchs- reihe	Nr.	Zusatz von		Gelöst in Wasser ccm	Kohlendioxyd in Gramm nach Tagen				
			g		1	2	3	4	5
I	1	Ohne Zusatz	—	—	0,81	0,96	0,99	—	—
	2				0,81	0,98	1,01	—	—
	3	Aluminium- sulfat	0,04	Vor	0,50	0,69	0,74	—	—
	4				0,52	0,71	0,73	—	—
	5	Ferrosulfat	0,04	Zusatz	0,63	0,68	0,69	—	—
	6				nicht	0,62	0,70	0,71	—
	7	Kobaltosulfat	0,04	gelöst	0,54	0,54	0,54	—	—
	8				0,52	0,54	0,54	—	—
II	1	Nur Zusatz von 2 ccm		2	0,80	—	1,42	1,50	1,52
	2	Wasser			0,80	—	1,40	1,48	1,50
	3	Mangano- sulfat	0,01	2	0,77	—	1,40	1,49	1,52
	4			2	0,80	—	1,44	1,51	1,53
	5	do.	0,04	2	0,71	—	1,35	1,45	1,48
	6			2	0,71	—	1,38	1,49	1,52
	7	do.	0,08	2	0,63	—	1,24	1,36	1,38
	8			2	0,60	—	1,23	1,35	1,38
	9	do.	0,20	2	0,46	—	0,96	1,11	1,14
	10			2	0,46	—	0,99	1,13	1,17

Bei den Dialyseversuchen (Tabelle IX, S. 153) wurden 100 ccm Saft 17 bzw. 24 Stunden gegen 1300 ccm destilliertes Wasser im Gürberschen Apparate dialysiert, ähnlich wie wir dies früher schon ausgeführt hatten.¹⁾ Hernach erfolgte Eindampfung des Dialysates im Vacuum bei 40—50° in 4—6 Stunden zu 20 ccm einer gelben Flüssigkeit. Dann wurde die Gärkraft des dialysierten, inzwischen bei 0° aufbewahrten Saftes, sowohl allein (Nr. 1 und 2) wie mit Zusatz des Dialysates (Nr. 3 und 4, bestimmt, und zum Vergleiche auch die Wirkung von Kochsaft auf den dialysierten Saft untersucht (Nr. 5 und 6).

¹⁾ Vgl. Buchner u. Antoni, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 210 (1905).

Tabelle VIII.

Preßsaft und verschiedene organische Stoffe.

Je 20 ccm Preßsaft + 20 ccm Wasser + verschiedene organische Stoffe
+ 8 g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol. 22°.

Ver- suchs- reihe	Nr.	Zusatz von			Kohlendioxyd in Grammen nach Tagen		
			g	Wasser ccm	1	2	3
I	1	Nur Zusatz von je 20 ccm		20	0,41	—	0,45
	2	Wasser		20	0,39	—	0,41
	3	Harnstoff	0,2	20	0,43	—	0,49
	4			20	0,46	—	0,48
	5	Glycocoll	0,2	20	0,41	—	0,42
	6			20	0,47	—	0,47
	7	Asparagin	0,2	20	0,41	—	0,43
	8			20	0,40	—	0,42
	9	Pepton Witte	1,0	20	0,38	—	0,39
	10			20	0,37	—	0,37
	11	Grünmalz	2,0	20	0,44	—	0,45
	12			20	0,42	—	0,43
II	1	Nur Zusatz von je 20 ccm		20	0,77	0,82	0,84
	2	Wasser		20	0,75	0,81	0,83
	3	Harnstoff	0,6	20	0,82	0,92	0,94
	4			20	0,80	0,90	0,93
	5	Glycocoll	0,6	20	0,80	0,89	0,90
	6			20	0,81	0,89	0,91
	7	Asparagin	0,6	20	0,78	0,86	0,88
	8			20	0,70	0,77	0,79
	9	Guanin	0,2	20	0,82	0,87	0,88
	10			20	0,79	0,84	0,84
	11	Pepton Witte	3,0	20	0,72	0,87	0,90
	12			20	0,72	0,83	0,84
	13	Antipepton	1,0	20	0,53	0,55	0,57
	14			20	0,52	0,56	0,56
	15	Hemialbumose	2,0	20	0,31	0,38	0,39
	16			20	0,31	0,38	0,40
	17	Protalbumose	2,0	20	0,33	0,36	0,37
	18			20	0,35	0,40	0,40
	19	Syntonin	1,0	20	0,82	0,82	0,85
	20			20	0,77	0,79	0,80

Die Gärkraft des dialysierten Saftes hatte in beiden Fällen sehr, fast bis zum Verschwinden, abgenommen und wurde durch Zusatz des eingedampften Dialysates bzw. von Kochsaft in der ersten Versuchsreihe auf das Dreifache und sehr viel mehr noch in der zweiten Versuchsreihe gesteigert.

Tabelle IX.

Gärwirkung des dialysierten Preßsaftes unter Zufügen von Dialysat bzw. Kochsaft.

Je 20 ccm dialysierter Preßsaft + Wasser bzw. Dialysat bzw. Kochsaft + 8 g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol. 22°.

Ver- suchs- reihe	Nr.	Wasser	Einge- dampf- tes Dialysat	Koch- saft	Kohlendioxyd in Grammen nach Tagen			
					1	2	3	4
I	1	10	0	0	0,07	0,09	0,09	—
	2	10	0	0	0,05	0,07	0,07	—
	3	0	10	0	0,30	0,33	0,33	—
	4	0	10	0	0,28	0,32	0,32	—
	5	0	0	10	0,11	0,21	0,27	—
	6	0	0	10	0,11	0,20	0,26	—
II	1	0	0	0	0,02	0,02	—	0,02
	2	0	0	0	0,02	0,02	—	0,02
	3	0	10	0	0,47	0,52	—	0,52
	4	0	10	0	0,48	0,53	—	0,53
	5	0	0	20	0,59	0,83	—	0,89
	6	0	0	20	0,58	0,79	—	0,90

Zur Bestimmung der Gärkraft der Acetonfällungen (Tabelle X, S. 154), deren Herstellung schon früher¹⁾ beschrieben ist, wurden die Niederschläge mit Wasser bzw. Kochsaft und Zucker im Gärkölbchen kräftig umgeschüttelt, da sie sich schwer benetzten und nicht vollständig auflösten, ohne zu filtrieren. Über die Resultate ist bereits im allgemeinen Teil berichtet. Die in der vierten Spalte angegebene Ausbeute an Fällung ist nur annähernd genau, da nicht hohe Ausbeute,

¹⁾ Buchner u. Antoni, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 211 (1905).

sondern nur möglichste Beschleunigung der Abtrennung vom Aceton angestrebt wurde. Die Menge an Niederschlag wird auch durch den wechselnden Gehalt des Preßsaftes an Eiweiß bedingt, der von der Qualität der Hefe und wahrscheinlich von der Gründlichkeit des Zerreibens abhängt.

Tabelle X.

Acetonfällungen des Preßsaftes und Kochsaft.

Je 2 bzw. 3 g Fällung + 20 ccm Wasser bzw. Kochsaft + 8 g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol. 22°.

Ver- suchs- reihe	Nr.	Fällung her- gestellt durch Eintragen von	Aus- beute g	Fäl- lung g	Wasser ccm	Koch- saft ccm	Kohlendioxid in Grammen nach Tagen				
							1	2	3	4	5
I	1	100 ccm Saft in 500 ccm Aceton	4,5	2	20	0	—	0,38	0,54	0,57	0,58
	2			2	20	0	—	0,41	0,56	0,58	0,59
	3			2	0	20	—	0,68	0,93	1,08	1,19
	4			2	0	20	—	0,70	0,95	1,12	1,21
	5	100 ccm Saft in 1000 ccm Aceton	5,5	2	20	0	—	0,35	0,49	0,50	0,51
	6	2	0	20	—	0,72	0,96	1,10	1,19		
II	1	100 ccm Saft in 100 ccm Aceton	14	3	20	0	0,43	—	0,45	—	—
	2			3	20	0	0,42	—	0,44	—	—
	3			3	0	20	0,71	—	1,26	—	—
	4			3	0	20	0,69	—	1,23	—	—
	5	100 ccm Saft in 500 ccm Aceton	16	3	20	0	0,58	—	0,62	—	—
	6			3	20	0	0,61	—	0,63	—	—
	7			3	0	20	0,85	—	1,43	—	—
	8			3	0	20	0,84	—	1,47	—	—
	9	100 ccm Saft in 1000 ccm Aceton	19	3	20	0	0,56	—	0,63	—	—
	10			3	20	0	0,60	—	0,64	—	—
	11			3	0	20	0,92	—	1,55	—	—
	12			3	0	20	0,92	—	1,54	—	—