

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.¹⁾

II. Mitteilung.

Von

Hans Euler und Beth af Ugglas.

(Der Redaktion zugegangen am 27. November 1910.)

I.

Veränderungen im Enzymgehalt lebender Mikroorganismen.

Das Studium der Entstehung der Enzyme im lebenden Organismus bildet den einen Teil unseres Arbeitsprogrammes. Das Ziel dieser Versuche ist, Organismen und Organe an gewissen Enzymen anzureichern, womöglich unter Verdrängung verwandter Enzyme, und die allgemeinen Methoden zu finden, welche zu diesem Ziele führen.

Die Frage: Unter welchen physikalischen und chemischen Bedingungen und bis zu welchen Grenzen ändert der lebende Organismus, speziell der Mikroorganismus seinen Enzymgehalt, hat, wiewohl eine außerordentlich große Zahl spezieller Beobachtungen und Studien zu diesem Thema vorliegen, bis jetzt eine systematische Bearbeitung nicht gefunden. Indessen stehen mit dieser Frage zwei Probleme in Zusammenhang, welche in letzter Zeit Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen sind, nämlich einerseits die Abhängigkeit des physiologischen Zustandes der Zelle von physikalischen und chemischen äußeren Bedingungen, ein Arbeitsgebiet, das von E. Chr. Hansen begründet wurde, und auf welchem das Berliner Institut für Gärungsgewerbe in neuerer Zeit wichtige Erfolge zu verzeichnen hat²⁾ und anderseits die Bezeichnung zwischen der Wirksam-

¹⁾ Zum Teil aus Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. III, Nr. 34.

²⁾ Siehe Delbrück, Wochenschr. f. Brauerei, Bd. XXIII, S. 513, 1906, sowie die neueren Arbeiten von P. Lindner und Henneberg in der gleichen Zeitschrift.

keit der isolierten Enzyme und dem Gehalt der Lösung an Salzen bzw. anderen Stoffen, wie z. B. Peptone, Kohlenhydrate usw.

Daß die Frage nach den Bedingungen der Enzyymbildung in lebenden Mikroorganismen bis jetzt nicht in weiterem Umfange aufgenommen worden ist, liegt zweifellos an den experimentellen Schwierigkeiten, welche mit solchen Arbeiten verknüpft sind, und an der großen Zahl der Versuche, welche den vielen mitbestimmenden Einflüssen zufolge notwendig werden.¹⁾

Durch chemische Veränderung der Nährlösung einer Kultur von Mikroorganismen, z. B. von Hefe, erzielen wir Wirkungen wesentlich verschiedener Art, welche wir etwa folgendermaßen einteilen können:

1. Fall. Durch Veränderung der Nährlösung wird in irgend einer Weise die durch die Menge anwesender Zellen gegebene Enzymwirkung vermehrt oder vermindert. Macht man die chemische Veränderung der Nährlösung rückgängig, so tritt auch sofort wieder die frühere Enzymwirkung auf: der Enzymgehalt bleibt also unverändert.

2. Fall. Verweilt der Mikroorganismus eine gewisse Zeit in der veränderten Nährlösung, so tritt eine Konzentrationsveränderung des Enzymes oder Enzymsystems²⁾ auf, welche, wenn die Zelle wieder in ihre ursprünglichen Bedingungen gelangt, nicht sofort rückgängig werden.

3. Fall. Es treten durch länger fortgesetzte Kultur dauernde Veränderungen ein; es handelt sich dann um Transformationen oder Spaltungen, eventuell um Mutation. Solche dauernden Veränderungen haben bekanntlich E. Chr. Hansen und Beijerinck an Hefe beobachtet, welche auf verschiedenen Nährsubstraten gezüchtet wurde. Über die eventuell dabei

¹⁾ So haben die ganz unzureichenden Versuche, welche Dubourg (Comptes rendus, Bd. CXXVIII, S. 440, 1899) mitgeteilt hat, der kritischen Nachprüfung durch A. Klöcker (Centralbl. f. Bakt. II, Bd. VI, S. 242) nicht standhalten können.

²⁾ Als Enzymsystem bezeichnen wir ein Enzym mit dem gesamten System seiner Koenzyme und der die Enzymwirkung beeinflussenden Aktivatoren und Hemmkörper.

entstehenden Variationen des Enzymgehaltes ist nichts bekannt, und überhaupt konnten zahlenmäßige Beziehungen über Mutation noch nicht festgestellt werden.

Wir haben zunächst solche Änderungen im Enzymgehalt studiert, die obigem Fall 2 entsprechen, und wir teilen die Ergebnisse unserer ersten Versuchsserien mit, da dieselben für die Fortsetzung der Arbeit bestimmend waren.

1. Invertase.

Arbeitsmethode: Unsere Versuche, welche zur ersten Orientierung dienen sollten, sind mit untergäriger Hefe der hiesigen Hamburger-Brauerei angestellt. Die Stammhefe wird im Carlsberg-Laboratorium aufbewahrt, sodaß die Versuche reproduzierbar sind; immerhin ist es natürlich wünschenswert, daß dieselben mit einer der bekannten, gut definierten Heferassen wiederholt werden, was bald geschehen soll.

Zunächst galt es, die geeignetste Versuchsmethodik ausfindig zu machen. Bekanntlich läßt sich die Invertase aus den lebenden Hefezellen nur in sehr unbedeutendem Grad extrahieren, und die Hefe muß deshalb vor der Extraktion mit Wasser in irgend einer Weise entwässert werden. Am gebräuchlichsten ist die Behandlung mit Alkohol oder Aceton oder die direkte Trocknung bei höheren Temperaturen. Über die relativen Ausbeuten, welche man bei Anwendung dieser Verfahren gewinnt, liegen keine Angaben vor, auch nicht über die Genauigkeit, mit welcher sich der Invertasegehalt¹⁾ bestimmen läßt.

Es wurde unter folgenden Bedingungen mit gewaschener und gut abgepreßter Hefe gearbeitet:

1. 30 g Hefe werden direkt in 250 ccm absolutem Alkohol gesiebt und sind mit demselben a) 3 Stunden b) 8 Stunden in Berührung. Die Hefe wird abgesaugt und im Vakuumexsikkator vom Alkohol befreit.

¹⁾ Es handelt sich hier natürlich nicht um absolute Gehaltsbestimmungen an Enzym, sondern um den durch Wasser unter bestimmten Bedingungen extrahierbaren Anteil der Invertase, welcher durch seine Wirkung auf Rohrzucker gemessen wird.

2. 30 g werden direkt in 250 ccm 95%igen Alkohols gesiebt und sind 3 Minuten mit demselben in Berührung. Die Hefe wird abgesaugt und im Vakuumexsikkator vom Alkohol befreit.

3. 30 g Hefe werden gesiebt und im Vakuum (20 mm) bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur getrocknet. Diese Trocknung nimmt etwa 30 Minuten in Anspruch.

4. 30 g Hefe werden behandelt, wie unter 3 angegeben, und dann während 2 Stunden im Trockenschrank allmählich ansteigend auf 50—80° erwärmt.

Der Wasserverlust der Hefe war nach den verschiedenen Behandlungen nicht ganz gleichmäßig. Die 30 g lieferten bei Versuch 1a und b 6,6 bzw. 6,3 g; bei Versuch 3 wurden 6,2 und bei Versuch 4 wurden 6,0 g erhalten. Versuch 2 ergab 8,3 g.

Die gesamte trockene Masse eines jeden Versuchs wurde nun fein verrieben und 20 Stunden bei Zimmertemperatur mit 100 ccm Wasser digeriert. Nach dieser Zeit wurde abfiltriert, 50 ccm des Filtrates wurden mit 10 g feuchtem Kaolin und einem Tropfen Eisessig verrieben und wieder abfiltriert. 2 ccm der klaren Lösung wurden nun zu 20 ccm einer 10%igen Rohrzuckerlösung pipettiert; hierauf wurde mit so viel verdünnter Salzsäure versetzt, daß die H-Konzentration 10^{-5} betrug, und auf 25 ccm aufgefüllt.

Die Beobachtungen der Drehungen geschahen ganz in der in voriger Mitteilung angegebenen Weise an den mit Natriumcarbonat versetzten Proben. Wir erhielten folgende Reaktionskonstanten:

Versuch:	$k \cdot 10^4$
1a	57
1b	59
2	48
3	61, 59, 57
4	51.

Man erhält also Extrakte von gleichem Invertasegehalt, sei es, daß man die Hefe mit absolutem Alkohol, sei es durch Trocknen im Vakuum entwässert. Steht, wie dies hier der

Fall ist, ein größerer Vakuum-Trockenschrank zur Verfügung, so ist letztere Methode der Entwässerung entschieden vorzuziehen.

Unsere Versuche zeigen also — und seither im hiesigen Laboratorium angestellte ausführlichere Versuchsreihen haben dies bestätigt, — daß durch die Behandlung der Hefe mit Alkoholäther nach Albert und Buchner oder durch Vakuum-trocknung nach Buchner aus einer und derselben Hefe Dauerpräparate hergestellt werden können, deren invertierende Wirksamkeit nicht mehr als 10% vom Mittelwert abweicht. Die durch den Extrakt dieser Dauerhefen hervorgerufene Reaktionsgeschwindigkeit ist also ein Maß für die Wirksamkeit des extrahierbaren Enzymsystems der Hefe. Auf die Frage, inwieweit die Reaktionsgeschwindigkeit dieses Extraktes auch ein Maß für den gesamten Invertasegehalt der lebenden Hefe ist, werden wir später zurückkommen.

Seit langer Zeit ist bekannt, daß Phosphorsäure und Phosphat auf die Gärkraft der Zellen einen günstigen Einfluß ausüben, und die Behandlung der Hefe mit Phosphaten ist deswegen schon öfters zur Regeneration von Hefe vorgeschlagen worden. An erster Stelle ist in diesem Zusammenhang das Regenerationsverfahren von Hayduck zu nennen, welches später durch Albert und dann durch E. Buchner und A. Spitta¹⁾ näher untersucht wurde. Aus der neuesten Zeit sei der Vorschlag von Moufang erwähnt, die Hefe durch Waschen mit Phosphorsäure zu regenerieren. Es hat sich hier immer um die Gärkraft bezw. um die Zymase-Wirkung gehandelt.

Welche Veränderung bei der Phosphatbehandlung der Hefe der Invertasegehalt erleidet, ist bis jetzt nicht untersucht worden.

Unsere Versuche über den Einfluß von Phosphat auf den Invertasegehalt der Hefe, welche im Herbst 1909 angestellt wurden, ergaben einen sehr starken Effekt, der, wie gleich erwähnt werden soll, in folgenden Versuchsreihen (Herbst 1910) nicht wieder erhalten wurde. Welche Umstände diese Ver-

¹⁾ Berichte der deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXXV, S. 1703, 1902.

schiedenheit verursacht haben, können wir noch nicht angeben, doch sei betont, daß die in der folgenden Tabelle mitgeteilten Zahlen das Mittel aus vielen Einzelversuchen darstellen, so daß Versuchsfehler ausgeschlossen sind.

Gewaschene und scharf abgepreßte Unterhefe aus der hiesigen Hamburgerbrauerei wurde teils mit Wasser teils mit 0,3%igen Lösungen von Natriumphosphat unter Zusatz von 2% Rohrucker 40, 60, 110 Minuten und 6 Stunden stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird die Hefe so schnell als möglich abgepreßt, mit Alkoholäther behandelt und extrahiert.

20 ccm des Extraktes wurden bis zu H-Ionenkonzentration 10^{-6} mit Essigsäure angesäuert und mit 50 ccm Rohrzuckerlösung gemischt. Von Zeit zu Zeit wurden der Mischung Proben entnommen und zur Messung der Inversionsgeschwindigkeit im Polarisationsapparat untersucht. Aus diesen Ablesungen wurden nach der Formel

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$$

die Reaktionskonstanten berechnet, welche das Maß für die relative Geschwindigkeit der Reaktion und also auch für den relativen Gehalt an extrahierbarem Invertasesystem liefern.

Dauer der Phosphatbehandlung der Hefe	0	40	60	110	360 Minuten
Relative Inversionsgeschwindigkeit	1	2,7	2,9	2,2	1,8

Man ersieht aus der Tabelle, daß der Extrakt aus der Dauerhefe, welche vor der Trocknung 40 Minuten mit einer 0,3%igen Lösung von Natriumphosphat behandelt worden ist, 2,7mal schneller invertiert wurde, als der analog dargestellte Extrakt aus einer Dauerhefe, welche dieser Phosphatbehandlung nicht ausgesetzt war.¹⁾

Der Einfluß der Phosphatbehandlung auf den Invertasegehalt der Hefe scheint in hohem Grad vom Zustand der Hefe

¹⁾ Die Mononatriumphosphatlösungen waren mit Natronlauge bis zur H-Ionenkonzentration 10^{-6} (nach kolorimetrischer Messung) neutralisiert worden; wir bezeichnen solche Lösungen im folgenden als neutrale.

vor der Phosphatbehandlung abhängig zu sein. In einer Reihe von 7 Parallelversuchen, bei welchen die Hefe mit etwa 0,5 bis 2% Mononatriumphosphatlösungen behandelt worden war, hat Herr E. Lindberg im Herbst dieses Jahres eine Steigerung der Invertasewirkung im Extrakt des Dauerpräparates im Verhältnis 1 : 1,3 gefunden. Zahlreiche noch später ausgeführte Versuchsreihen, welche demnächst ausführlicher mitgeteilt werden sollen, haben einen noch geringeren Einfluß der Phosphate auf den Invertasegehalt der Hefe erkennen lassen, wenigstens sofern man denselben aus dem Verhalten der Vakuumdauerpräparate zu ermitteln versucht.

Zymase.

Die gleichen Präparate, an welchen der Invertasegehalt studiert wurde, dienten auch zur Untersuchung der Gärkraft. Bei diesen Versuchen wurde stets 1 g Trockenhefe in 20 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung aufgeschlämmt. Es ergaben sich hier zunächst starke Effekte; durch Behandlung mit neutralem Natriumphosphat unter den auf S. 284 angegebenen Bedingungen wurden die folgenden relativen Gärungsgeschwindigkeiten erhalten.

Dauer der Phosphatbehandlung der Hefe	0	40	60	110 Minuten
Relative Gärungsgeschwindigkeit	1	2	2	1,6

Eine hierauf folgende Versuchsreihe mit nicht neutralisiertem, also saurem Mononatriumphosphat ergab hingegen eine Schwächung und zwar von 1 auf 0,55.

Gleichzeitig mit diesem Versuch wurden Parallelversuche mit der gleichen Hefe angestellt, welche in analoger Weise durch Monophosphat behandelt, aber nicht getrocknet worden war, sondern sofort abgepreßt in die Zuckerlösung gebracht wurde. Hier zeigte sich im Gegensatz zu dem mit Dauerhefe erhaltenen Ergebnis eine Erhöhung der Gärkraft durch die Phosphatbehandlung.

Dies lenkte unsere Aufmerksamkeit auf die Vorgänge, welche beim Trocknen der Hefe stattfinden, und auf die Frage, wodurch die Gärkraft der Hefe in den Vakuumdauerpräparaten so außerordentlich geschwächt ist.

Läßt man 1 g lebende Hefe in 10%iger Zuckerlösung gären und untersucht unter den gleichen Umständen die gleiche Hefemenge, nachdem sie zuvor in ein Vakuumdauerpräparat verwandelt worden war, so verhalten sich die nach 3 Stunden entwickelten Kohlensäuremengen wie 20:1. Diese letztere Tatsache schien uns einer eingehenden Überlegung wert. Die Trocknung der Hefe im Vakuum geschah bei unseren Versuchen bei 40° und die erwähnte starke Schwächung der Gärungsgeschwindigkeit kann somit nicht auf die Temperaturempfindlichkeit der Zymase geschoben werden. Nach 5 Minuten ist nämlich die im Passburgschen Apparat gut ausgebreitete Hefe fast wasserfrei und selbst durch eine 5 Minuten lange Einwirkung von 40° wird die Zymase nur wenig geschwächt, wie aus den Versuchen, welche Buchner mit Hefepreßsaft bei verschiedenen Temperaturen angestellt hat, deutlich hervorgeht. Außerdem ist daran zu erinnern, daß dieselbe Schwächung, welche die Hefe durch Trocknen erfährt, auch bei der Alkoholätherbehandlung eintritt.

Man hat diese Schwächung zuweilen mechanisch gedeutet, nämlich so, daß die Schrumpfung der Zellwände, welche bei der Herstellung des Dauerpräparates eintritt, die Durchdringlichkeit der Zellwände vermindert. In diesem Falle mußte eine starke Erhöhung der Gärkraft der Dauerhefe eintreten, wenn die Zellwände durch Verreiben zerrissen werden. Tatsächlich ist aber, wie der eine von uns festgestellt hat,¹⁾ der Einfluß des Verreibens ein recht geringer.

Die starke Inaktivierung der Hefe bei der Herstellung von Dauerpräparaten bedarf also noch der weiteren Aufklärung. Als Arbeitshypothese kann man einstweilen wohl folgende Vorstellung annehmen:

Die Zymase ist in der lebenden Hefe als chemischer Komplex ganz oder teilweise an das Prote-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI.

plasma¹⁾ gebunden; wird die vitale Tätigkeit der Zelle dauernd oder zeitweilig aufgehoben, so wird auch die gärungserregende Gruppe des Protoplasmas, also die an das Plasma gebundene Zymase, inaktiviert; wirksam bleibt nur derjenige Teil des Gärungsenzymes, welcher (frei ist oder) bei der Entwässerung der Hefe im Vakuum oder durch Alkohol freigemacht wird.

Zur Prüfung dieser Annahme haben wir Versuche mit Giften bzw. antiseptischen Stoffen angestellt und haben uns an die Angaben erinnert, welche E. Buchner in seiner Monographie²⁾ über den Einfluß von Chloroform und Toluol auf die Gärung durch lebende Hefe gemacht hat. Mit Chloroform hat er folgende Versuche ausgeführt:

1. Versuchsreihe: a) 45 ccm frischer Hefepreßsaft + 7,5 g Rohrzucker + 2 ccm Chloroform lieferten unter beständiger Luftdurchleitung bei Zimmertemperatur innerhalb 25 Stunden 1,03 g Kohlendioxyd. — b) 20 g Hefe (die nämliche, aus welcher der Preßsaft bereitet worden war) + 7,5 g Rohrzucker + 2 ccm Chloroform mit Meissls Nährsalzlösung auf das Volumen der Flüssigkeit bei Versuch a aufgefüllt, gaben unter beständiger Luftdurchleitung bei Zimmertemperatur innerhalb 25 Stunden 1,46 g Kohlendioxyd. — Bei einem Kontrollversuch c): 20 g Hefe + 7,5 g Rohrzucker + Meissls Nährsalzlösung wie bei b, aber ohne Chloroformzusatz, trat schon nach einigen Stunden Überschäumen ein und nach 25 Stunden Stehen war kein Zucker mehr nachzuweisen.

2. Versuchsreihe: a) 45 ccm frischer Hefepreßsaft + 5 g Rohrzucker + 1 ccm Chloroform lieferten bei Luftdurchleiten und Zimmertemperatur nach 30° 1,68 g Kohlendioxyd. b) 15 g derselben Hefe, aus welcher der Preßsaft hergestellt wurde, + 5 g Rohrzucker + 1 ccm Chloroform + soviel von

¹⁾ Unter Protoplasma soll hier nichts anderes verstanden werden, als diejenige Substanz, welche der Träger der typischen Lebensfunktionen ist.

²⁾ E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung. 1903. S. 176.

Meissls Nährsalzlösung, daß im ganzen 46 ccm, geben unter denselben Bedingungen nach 30 Stunden 1,17 g Kohlensäure.

Selbst haben wir Versuche mit relativ geringen Hefemengen angestellt. Wir erhielten in 3 Stunden bei 30° mit 0,5 g Hefe aus 40 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung:

mit		0,0010 g CO ₂
ohne	1 ccm Chloroform	0,3825 g CO ₂ .

Ein ähnlicher Versuch wurde mit Toluol ausgeführt: Angewandt 0,5 g Hefe auf 40 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung bei 30°.

Innerhalb 3 Stunden entstehen

mit		0,0008 g CO ₂
ohne	1 ccm Toluol	0,3905 g CO ₂

In diesem Verhalten der Hefe gegen antiseptische Stoffe und Gifte sehen wir, wenn auch keinen strengen Beweis, so doch eine wesentliche Stütze für unsere obige Annahme, daß die Zymasegruppe der lebenden Hefe eine Komponente des Plasmas ist. So lange die Zymasegruppe einen Teil des Plasmas bildet, überträgt sich die chemische Veränderung, auf welcher die Vergiftung beruht, auf die Zymasegruppe, welche somit auch inaktiviert wird. Die chemische Beeinflussung geschieht also indirekt durch das Protoplasma.

Die vom Plasma abgetrennte Zymase — sei es, daß die Abtrennung mechanisch oder durch Erwärmen erfolgt — ist somit unempfindlich gegen Antiseptika, wie ja bekanntlich die meisten Enzyme. Tatsächlich wird nach Buchners Angaben die Zymase des Hefepreßsaftes nicht durch Chloroform geschwächt und das Gleiche gilt von Dauerhefe, wie wir uns selbst überzeugt haben.

An seine Versuche mit Chloroform knüpft Buchner folgende Bemerkung:

«In beiden Versuchsreihen lieferten also die mit Chloroform versetzten Hefemassen Kohlendioxyd, aber nicht mehr, als dem Zymasevorrat entsprechen dürfte; es wurde lange nicht aller Zucker vergoren, was dem Kontrollversuch c der ersten Versuchsreihe gemäß bei ungehindertem Wachstum der Hefe zu erwarten gewesen wäre. Über die Toluolveruche

sagt Buchner: Es bilden sich nur Spuren von Kohlendioxyd entsprechend dem in den Zellen vorhandenen Zymasevorrat. Dieselbe Hefe gab unter den gleichen Bedingungen, aber ohne Toluolzusatz lebhaftere Gärung, d. h. es fand fortwährend Neubildung von Zymase statt.

Die Frage, ob die Hefe während der Gärung ihre Zymase in dem hier angedeuteten Grade verbraucht und sie ständig regeneriert, scheint uns von solcher Bedeutung, daß eine Diskussion derselben hier wohl gerechtfertigt ist.

Wie es sich mit den Spuren Kohlendioxyd auch verhält, welche durch Hefe in Gegenwart von Chloroform und Toluol entwickelt werden — wir werden darüber noch weitere Versuche anstellen —, so ist doch sicher die pro Zeiteinheit entwickelte Menge Kohlensäure höchstens $\frac{1}{100}$ der normalen; man müßte also, wenn man die von Buchner u. a. geäußerte Vorstellung akzeptiert, annehmen, daß die Hefe in dem Moment, in welchem die Gärung unterbrochen wird, nur etwa diejenige Zymasemenge enthält, welche in der normal gärenden Hefe zur Wirksamkeit kommt. Man muß ja, wenn die äußeren Bedingungen, wie Gehalt an Koenzymen, Aktivatoren usw. ungeändert bleiben, Wirkung und Enzymgehalt proportional setzen.

Die erwähnte Annahme einer Regeneration scheint uns besonders mit folgenden zwei Tatsachen nicht vereinbar:

1. Es ist seither bekannt geworden, daß die Zymase bei der Gärung durch Hefepreßsaft und durch Dauerhefe nicht verbraucht wird. Bei der Gärung mit Preßsaft bleiben nämlich die Konstanten

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$$

in der ersten Hälfte der Reaktion, d. h. so lange kein Eiweiß ausfällt und die Wirkung der Endotryptase nicht überhand nimmt, konstant. Bei der Gärung mit Dauerhefe steigen sogar die Konstanten; eine Abnahme an Enzym kann also in diesen Fällen nicht eingetreten sein. Daß nur in der lebenden Hefe die freie Zymase verbraucht wird, ist sehr unwahrscheinlich.

2. Selbst die Dauerhefe ist sehr viel wirksamer, als lebende

Hefe in Gegenwart von Chloroform; keinesfalls ist aber in der lebenden Hefe der Gehalt an aktiver Zymase kleiner als in der Dauerhefe, aller Wahrscheinlichkeit nach viel größer, und die lebende Hefe muß somit mindestens ebensoviel Zymase enthalten wie die Dauerhefe, also jedenfalls mehr, als bei der Chloroformgärung zur Wirksamkeit kommt.

Eine Neubildung von Zymase durch die Bildung neuer Zellen, also durch Hefevermehrung, kommt bei so kurzen Gärungszeiten wie 3 Stunden selbst in Gegenwart von Nährlösung nur wenig in Betracht, sie beträgt höchstens 1—2% der ursprünglichen Menge.

Mit obigen Tatsachen steht andererseits unsere Annahme, daß die Zymase der lebenden Hefe eine Komponente des Protoplasmas ist, gut im Einklang.

Auf einige Konsequenzen dieser Annahme werden wir in einer folgenden Mitteilung zurückkommen.