

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.

IV. Mitteilung.

Über die Anpassung einer Hefe an Galaktose.¹⁾

Von

Hans Euler und David Johansson.

Mit vier Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 16. März 1912.)

Die hier mitzuteilenden Versuche schließen sich an Arbeiten an, welche der eine von uns vor 2 Jahren mit Beth af Ugglas²⁾ begonnen hat. Die damaligen Versuche betrafen die Bildung von Invertase und Zymase in Bierhefe; sie hatten zunächst recht schwankende Resultate geliefert. Dies beruhte zum großen Teil auf der gebräuchlichen Methodik, den Enzymgehalt von Hefen durch Untersuchung der Trockenpräparate zu ermitteln; diese Methodik liefert, wie bald gefunden wurde,³⁾ nicht immer zuverlässige Resultate. Andererseits hatten wir damals zur Anreicherung an Enzym mit reinen Rohrzucker- und Phosphatlösungen gearbeitet, also unter Bedingungen, welche, wie sich zeigte, der Enzymbildung nicht günstig sind.

Diese Untersuchungen sind seither fortgesetzt worden,⁴⁾ und es hat sich durch Anwendung zuckerhaltiger Nährlösung der zeitliche Verlauf der Bildung von Invertase und der Gärungsenzyme verfolgen lassen.

¹⁾ Z. T. aus Svenska Vet. Akad. Arkiv för Kemi, Bd. 4. Nr. 23.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 279, 1911.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 71, S. 14, 1911.

⁴⁾ Rep. British Association for the Adv. of Science Porthmouth 1911.
Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 388, 1912.

Schon vor langer Zeit sind Beobachtungen gemacht worden, welche darauf hindeuten, daß Mikroorganismen sich an Nahrungsmaterial anpassen können, auf welchem zu leben sie nicht gewohnt sind. Seit der Entwicklung der Enzymologie ist dann die Frage studiert worden, ob die Anpassung mit der Neubildung von Enzymen verknüpft ist, und welche Einflüsse zu einer Änderung im Enzymgehalt der lebenden Zellen führen können.

Die verschiedenen Untersuchungen haben nicht zu übereinstimmenden endgültigen Ergebnissen geführt: immerhin sind die vorliegenden Angaben wichtig als Ausgangspunkte für weitere Arbeiten, weshalb wir einen kurzen Überblick über die frühere Forschung unseren eigenen Versuchen voranstellen. Wir beschränken uns dabei auf die Literatur, welche sich auf die Enzyme der Kohlenhydrate bezieht.

Vorhergehende Arbeiten.

Wortmann¹⁾ lenkte die Aufmerksamkeit auf die interessante Tatsache, daß gewisse Bakterien nur dann ein Stärke lösendes Enzym bilden, wenn sie auf Stärke als Kohlenstoffquelle angewiesen sind, wenn ihnen also kein anderes Kohlenstoffmaterial geboten wird. Nicht allein Weinsäure, sondern auch Eiweiß (vermöge seines Kohlenhydratgehalts) hemmt die Diastasebildung.

Bemerkenswert ist ferner sein Ergebnis, daß bei Hefen die Invertasebildung durch Zusatz von Traubenzucker nicht unterdrückt werden konnte.

Bald darauf machte Büsgen (Ber. d. d. Bot. Ges., Bd. 3. S. 66; 1885) die Beobachtung, daß *Aspergillus Oryzae* auch auf stärkefreiem, zuckerhaltigem Nährsubstrat Diastase bildet.

Nach Fermi und Répetto (Zentralbl. f. Bakt. (I). Bd. 31. S. 403; 1902) bilden auch viele Bakterien Amylase auch in Abwesenheit von Stärke.

Auch Effront²⁾ kam, wie Wortmann, zu dem Ergebnis, daß Rohrzucker keinen Einfluß auf den Invertasegehalt der

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 6. S. 316. 1882.

²⁾ Die Diastasen und ihre Rolle in der Praxis. Übers. v. Bücheler. Leipzig, Dentike 1900. S. 74 u. ff.

Hefe ausübt, daß sie vielmehr auch bei Ernährung mit einem direkt assimilierbaren Kohlenhydrat gebildet wird. Als einen Faktor von größter Bedeutung erkannte er die Stickstoffnahrung.

Dieselbe Beobachtung hatte kurz vorher Fernbach¹⁾ gemacht, welcher feststellte, daß z. B. Pepton, gewissen Nährlösungen zugesetzt, die Invertasebildung stark beförderte.

Bakterien bilden auch auf eiweißfreien Lösungen Invertase (Fermi und Montesano, Zentralbl. f. Bakt. (II), Bd. 1, S. 482; 1895). Die Bildung von Diastase ist bei verschiedenen Mikroorganismen in sehr ungleichem Grade abhängig von dem Kohlenhydrat der Nährlösung. (Beijerinck, Arch. Neerl, Bd. 14, S. 23; 1891. — Katz, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 9, S. 157; 1891.)

An einem *Aspergillus* fand Duclaux²⁾ bei Ernährung mit Calciumlactat zu der Nährlösung Amylase, dagegen keine Invertase, kein Labenzym und keine Proteinase; bei Gegenwart von Zucker wurde dagegen Invertase abgeschieden, aber kein anderes Enzym. Ähnliche Resultate, aber auch individuelle Verschiedenheiten an *Penicillium glaucum* beobachtet. Da die Angaben der Versuchsanordnung oft nicht genügend vollständig sind, um sichere Schlüsse zu gestatten, so mag es genügen, hier auf diese Untersuchung hingewiesen zu haben.

Bei weitem fester stehen die Ergebnisse von E. Chr. Hansen.³⁾ Er kam zu dem Resultat, daß es nicht gelingt, Hefezellen so zu verändern, daß sie Enzyme bilden, welche sie vorher nicht besitzen.

Eine weitere, wertvolle Untersuchung verdankt man Went,⁴⁾ welcher die Enzyymbildung in *Monilia sitophila* studierte. Er konnte 3 Enzymgruppen unterscheiden; Maltase wird von der Zelle bei der Ernährung mit gewissen Kohlenhydraten, nämlich Raffinose, Dextrin, Stärke, Glykogen, Cellulose, ferner Trehalose, Galaktose, Xylose und Saccharose gebildet, auch Pepton war wirksam, vermutlich wegen seines Zuckergehaltes.

¹⁾ Annales de l'Inst. Pasteur, Bd. 3, S. 473 u. 531, und Bd. 4, S. 641; 1889 und 1890.

²⁾ Traité de Microbiologie, Bd. 2, S. 84, 1899.

³⁾ Medd. fra Carlsberg-Lab., Bd. 5, S. 1, 1900.

⁴⁾ Jahrb. f. wissenschaftl. Bot., Bd. 36, S. 611, 1901.

Trypsin und Lab wurden nur in Gegenwart der entsprechenden Substrate gebildet. Amylase und Invertase traten unabhängig von der Ernährung auf.

Aus Versuchen von Cecil Revis¹⁾ ging hervor, daß Bakterien der Coli-Gruppe ihren Enzymgehalt leicht verändern.

Sehr interessante Beobachtungen über das Auftreten von Enzymwirkungen bei der Kultur in gewissen Nährlösungen hat Burri²⁾ mitgeteilt. Gewisse Stämme des Bakterium Coli bilden bei der Kultur auf sogenannten Endoplatten zunächst weiße Kolonien, welche Milchzucker nicht vergären; nach einiger Zeit aber tritt eine rote Form auf, welche nun die Fähigkeit der Milchzuckervergärung besitzt, bei weiterer Züchtung bleibt dann diese Fähigkeit erhalten; die Milchzucker vergärenden Stäbchen bilden nicht wieder eine die Lactasewirkung entbehrende Form zurück.

Wie Burri sagt, haben wir es hier mit einer typischen Anpassung zu tun, indem die Zellen sich an die Bildung derjenigen Enzyme gewöhnen, welche zur Verarbeitung eines neuen Nährmaterials erforderlich sind.

Nach den Ergebnissen von Duclaux (l. c.) schien es, daß *Aspergillus* eine besonders weitgehende Anpassungsfähigkeit in bezug auf Enzymbildung besitze. Zu den früheren Arbeiten, welche im Gegensatz zu Duclaux zeigen, daß auch bei diesem Pilz die Enzymbildung vielfach unabhängig vom Nährmedium ist, kommt eine neue von J. Boselli.³⁾

Die Ausscheidung der Inulase aus *Aspergillus niger* findet nämlich statt sowohl in Lösungen von Inulin als von Rohrzucker, Glukose und anderen Kohlenhydraten.

1899 glaubte Dubourg⁴⁾ gefunden zu haben, daß solche Hefen, welche keine merkbare Fähigkeit besitzen, Rohrzucker zu invertieren, und sich deswegen in Lösungen dieses Zuckers nicht entwickeln und denselben vergären können, diese Fähig-

¹⁾ Zentralbl. f. Bakt. (2), Bd. 26, S. 161, 1910.

²⁾ Zentralbl. f. Bakt. (2), Bd. 28, 1911.

³⁾ Ann. Inst. Pasteur, Bd. 25, S. 695, 1911.

⁴⁾ Compt. rend., Bd. 128, S. 440, 1899.

keiten erlangen, d. h. Invertase bilden, wenn man sie in folgender Weise behandelt.

Die betreffende Hefenart wird in einer stickstoffreichen Nährlösung kultiviert, in welcher 5% Traubenzucker und 5% Rohrzucker aufgelöst werden. Wenn die Gärung vorüber ist, wird die Flüssigkeit vorsichtig abgegossen und die Hefe wird mit destilliertem Wasser gewaschen. Trägt man nun die so ausgewaschene Hefe in eine Nährlösung ein, so erweist sich der Rohrzucker innerhalb 24 Stunden invertiert und die Gärung ist in vollem Gang.

Dubourg teilt weiter mit, daß er ähnliche Versuche mit gleichem Ergebnis mit Galaktose angestellt hat.

Diese Arbeit, welche Duclaux im nächsten Jahr in seinem *Traité de Microbiologie* (3) 1900 ausführlich referierte, erfuhr alsbald eine kritische Nachprüfung durch A. Klöcker. Seinen offenbar sehr exakten Versuchen schickt Klöcker die Bemerkung voraus, daß aus Dubourgs Veröffentlichung nicht hervorgeht, mit welchen Heferasen dieser gearbeitet hat und besonders, daß der Nachweis fehlt, daß die von Dubourg untersuchten Hefen wirklich zu Beginn der Versuchsreihen diejenigen Enzyme, deren späteres Auftreten beobachtet wurde, nicht enthalten haben.

Klöcker stellt seine Kontrollversuche mit folgenden vier Hefearten an: *Sacharomyces Apiculatus*, *S. Marxianus*, *S. Ludwigii* und mit einer neuen Art, welche er selbst im Verdauungskanal von Honigbienen gefunden hatte.

Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt. Eine junge, kräftige Vegetation *S. Apiculatus*, welche im Verlauf von drei Tagen bei 25° in einer Lösung von Glukose und Rohrzucker in Hefewasser herangezüchtet war, wurde in Hefewasser ausgesät, welches 5% Glukose und 5% Rohrzucker enthielt. Nach fünf Tagen wurde die Flüssigkeit abgegossen, die Hefe mit sterilem Wasser bei 3° gewaschen. Mit der so ausgewaschenen Hefe wurde teils ein Kolben infiziert, welcher Hefewasser mit 10% Saccharose, und ein anderer, welcher Hefewasser mit 5% Glukose und 5% Rohrzucker ent-

¹⁾ Medd. fra Carlsberg Lab., Bd. 5, S. 55, 1900. Vgl. auch die neuere Untersuchung Klöckers, ebenda, Bd. 10, S. 90, 1911.

hielt. Versuchstemperatur 25° . Die Kulturen wurden täglich mit Hilfe von Fehlings Lösung in bezug auf ihr Reduktionsvermögen geprüft. Noch nach dem neunten Tag zeigte die Lösung, welche nur Saccharose enthielt, keine Spur von Reduktion und es hatte also keine Inversion stattgefunden.

Nachdem die Hefe zum zweitenmal mit 5% Glukose und 5% Rohrzucker während 6 Tagen bei 25° behandelt worden war, wurde die Lösung abgegossen und die Hefe ohne Auswaschen in Hefewasser, welches 10% Rohrzucker enthielt eingetragen. Auch jetzt zeigte sich keine Fähigkeit, die Saccharose zu invertieren.

Entsprechende Resultate wurden mit den anderen Hefearten erhalten und Klöcker fast dieselben folgendermaßen zusammen:

«Dubourgs Angabe, daß Hefe, welche ein Enzym nicht enthält, zur Hervorbringung dieses Enzymes durch Gewöhnung an das entsprechende Substrat veranlaßt werden kann, ist unrichtig. Folglich ist auch der von Duclaux daraus gezogene Schluß, daß das Verhalten der Hefen zu Zuckerarten nicht zur Charakterisierung der Arten benutzt werden kann, nicht richtig.»

Gleichzeitig mit Dubourg hat Dienert¹⁾ ähnliche Versuche zur Gewöhnung der Hefen an Zuckerarten angestellt und hatte besonders die Galaktose in den Bereich seiner Studien gezogen. Er kam zu dem Ergebnis, daß die Resultate, welche Dubourg in bezug auf die Saccharide erhalten hatte, auch in bezug auf Galaktose gelten.

Nach den negativen Ergebnissen Klöckers und seiner Kritik der Versuche von Dubourg schienen auch diejenigen von Dienert wenig Vertrauen zu verdienen. Indessen ist seitdem die Tatsache, daß sich zahlreiche Bierhefen an die Vergärung von Galaktose gewöhnen, mehrfach bestätigt worden.

Schon früher hatten Fischer und Thierfelder²⁾ gefunden, daß zahlreiche Hefearten die Galaktose zu vergären imstande sind. Dies wurde in bezug auf Ober- und Unterhefen von Ban³⁾ und später von mehreren anderen Forschern

¹⁾ Ann. Inst. Pasteur. Bd. 14. S. 139. 1900.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 27. S. 2031. 1894.

³⁾ Zeitschr. f. Spiritus-Industrie. 1896.

bestätigt. Andererseits existieren nach Voit, Cremer und Ban Hefen, welche Galaktose nicht vergären. Zu dem gleichen Ergebnis kam kürzlich auf Grund ausführlicher Versuche E. F. Armstrong.¹⁾

Dienert scheint seine Galaktose ziemlich vollständig gereinigt zu haben; er behandelte sie zuerst nach Bourquelot mit Alkohol und entfernte hierauf die noch anwesende Glukose durch *Saccharomyces Ludwigii*.

Die Anpassungsversuche führte Dienert in folgender Weise aus:

Er füllte eine Anzahl Röhren mit Hefe, welche teils an Glukose teils an Galaktose gewöhnt worden war. In jedes derselben wurden 5 ccm einer 6%igen Galaktoselösung gegeben. Man stellte dieselben in einen Thermostaten von 25° und notierte den Augenblick, in welchem sich eine Gasblase per Sekunde zu entwickeln begann. Dieser Augenblick wurde als Anfang der Gärung notiert. Alle Röhren, welche an Galaktose gewöhnte Hefe enthielten, goren im Verlaufe von zwei Stunden. Diejenigen, die an Glukose gewöhnte Hefe enthielten, zeigten während 24 Stunden und oft noch länger nicht die mindeste Gärung. Es zeigte sich also eine große Differenz bezüglich des Beginns der Gärung durch die einerseits an Glukose, andererseits an Galaktose gewöhnte Hefe. Auffallend ist die Angabe, mit welcher Dienert seinen Bericht fortsetzt:

«Une fois la fermentation du galactose commencée par ces dernières, elle marche aussi vite qu'avec les levures habituées au galactose. Il faut donc penser qu'un travail intérieur a dû se faire pendant la période d'inactivité de la levure.»

Dieses Ergebnis ist mit unserer eigenen Erfahrung nicht vereinbar. Wir müssen weiter Dienert wörtlich zitieren:

«Nous laissons de côté pour le moment les levures de lactose. C'est que celles-ci, habituées au glucose, manifestent une certaine habitude au galactose. Ainsi, au bout de 2 heures, chez certaines de ces levures habituées au glucose, on obtient un commencement de fermentation du galactose, mais il faut ajouter qu'habituées au galactose ou au lactose ces levures

¹⁾ Proc. Roy. Soc. (B.), Bd. 76, S. 600. 1905.

manifestent une activité vis-à-vis du galactose presque inconnue chez les autres. Voici en effet quelques nombres.

Levure lactose	Oirigine	La fermentation commence après
Duclaux	Saccharose	24 heures
	Galactose	1 heure
Kayser	Saccharose	2 heures
	Galactose	1 heure
	Lactose	30 minutes.

Über das Verhältnis der Vergärung der Glukose und der Galaktose macht Dienert folgende Angaben: Läßt man eine an Galaktose gewöhnte Hefe auf eine Glukoselösung einwirken, so zeigt sich ein bestimmtes Verhältnis zwischen den in 24 Stunden vergorenen Zuckermengen. Dieses Verhältnis R erwies sich bei drei verschiedenen Hefen annähernd konstant.

Hefe	Gewicht der Hefe in mg	R
Hefe Bass	108	1,6
Hefe der Brennerei Alfort	91	1,65
Weinhefe Nr. 6	85	1,5

Um die Dauer der Anpassung zu bestimmen, wurden Versuche angestellt, welche Dienert durch folgende Tabelle wiedergibt. In denselben bezeichnet 1 und 3 Hefen, welche an Glukose. 2 und 4 Hefen, welche an Galaktose gewöhnt worden waren.

Röhre 1	Röhre 2	Röhre 3	Röhre 4
Man fügt 4 ccm Glukose-		Man fügt 4 ccm Galaktose-	
lösung zu		lösung zu	
Die Gärung beginnt nach			
2 Stunden	2 Stunden	48 Stunden	2 Stunden.
Jede Gasentwicklung hört auf nach			
5 Tagen	5 Tagen	10 Tagen	5 Tagen.
Man fügt am Ende der Gasentwicklung zu			
Galaktose	Galaktose	Galaktose	Glukose.
Die Gärung beginnt nach			
5 Tagen	12 Stunden	1 Stunde	1 Stunde.

«Man setzt nun zur Röhre 4 Galaktose, dann beginnt die Gärung nach Verlauf von 12 Stunden. Diese beiden Beispiele zeigen also, daß, wenn eine an Galaktose gewöhnte Hefe Glukose vergärt, sie einen Teil ihrer Anpassung verliert.»

Wir können dieses Ergebnis nicht bestätigen.

«En résumé, nous venons de voir et de démontrer qu'une levure dont le développement s'était effectué en l'absence de galactose éprouve pendant un certain temps une sorte de répulsion pur ce sucre avant de l'attaquer. Nous désignerons ce temps sous le nom de période d'accoutumance.»

Je konzentrierter die Zuckerlösung ist, an welche sich die Hefe zu gewöhnen hat, desto kürzer ist nach Dienert die Dauer der Anpassung. «Certaines levures de lactose qui semblaient faire un groupe à part, à cause de leur courte durée d'accoutumance, rentrent dans la catégorie des autres levures quand on diminue la concentration de sucre du milieu de culture.»

Dienert macht die Angabe, daß die Hefe eine gewisse Menge Galaktose absorbiert. Er schließt dies daraus, daß eine Quantität dieses Zuckers bei der Gärung verschwindet, ohne daß die entsprechende Menge Kohlensäure auftritt. Diese Erscheinung schien dem genannten Autor für Galaktose charakteristisch zu sein. Auch dies ist nach unserer eigenen Erfahrung nicht der Fall; auch bei der Vergärung von Glukose und Maltose tritt eine je nach Temperatur, Zucker- und Hefemenge variierende Differenz zwischen verschwundenem Zucker und entwickelter Kohlensäure auf.

Nicht ohne weiteres verständliche Ergebnisse teilt Dienert über den Einfluß von Toluol auf die Anpassung mit. «Das Toluol wirkt auf die Anpassung und auf die alkoholische Gärung ein, und zwar mit der gleichen Energie, welches auch die Natur des zerlegten Zuckers sei. «Cette action du toluène est due à l'influence de ce corps augmenté de celle de l'alcool.»

Die theoretischen Betrachtungen, welche Dienert seinen Experimenten zufügt, müssen im Original nachgesehen werden. Man muß sagen, daß dieselben ebenso wie die Darstellung der Versuche viele Unklarheiten enthält. Es ist infolgedessen schwierig, einigermaßen sichere Schlüsse aus Dienerts Arbeit zu ziehen.

Sehr viel zuverlässiger als die Angaben von Dienert sind diejenigen von Slator,¹⁾ welcher ebenfalls fand, daß Hefen an die Vergärung von Galaktosen gewöhnt werden können.

Schließlich ist noch eine interessante Mitteilung von Harden und Norris²⁾ zu erwähnen: sie akklimatisierten *Saccharomyces Carlsberg I* an Galaktose und fanden, daß der aus akklimatisierter Hefe gewonnene Preßsaft ebenfalls die Fähigkeit besitzt, die Galaktose zu vergären. Die Vergärung dieser Zuckerart verläuft dann normal, Phosphate und Arseniate beeinflussen die Galaktosegärung in der gleichen Weise wie diejenige der Maltose und Glukose.

Lindner hat neuerdings (Wochenschr. f. Brauerei 1911, Nr. 6) mit seiner Kleingärungsmethode bemerkenswerte Beobachtungen über die Vergärbarkeit der Galaktose und anderer Kohlenhydrate mitgeteilt, auf welche wir bald zurückkommen werden.

Im Anschluß an den Bericht über die Anpassungerscheinungen, welche an Mikroorganismen beobachtet worden sind, sollen auch kurz die Versuche erwähnt werden, welche die sogenannte Regeneration der Hefen betreffen. Auch hier handelt es sich, wie schon Delbrück, Buchner, Lange u. a. hervorgehoben haben, um eine Vermehrung des Enzymgehaltes der Hefe. Die Regeneration geschieht nach dem Verfahren von M. Hayduck³⁾ durch Lagern der Hefe in einer stickstoffarmen Lösung, welche etwa 8% Rohrucker, etwa 0,1 g Dikaliumphosphat und 0,25% Magnesiumphosphat und Hopfenauszug enthielt. Aus der so behandelten Hefe wird ein Preßsaft gewonnen, dessen Gärkraft in einem Fall um 85%, in dem anderen Falle um 44% erhöht war. Diese Anreicherungsversuche wurden dann von Buchner und Spitta⁴⁾ aufgenommen; dieselben regenerierten nach obiger Methode 4 und 8 Stunden lang, trugen die Hefe unmittelbar darauf in Aceton ein und verarbeiteten sie auf Dauerhefe. Das erstrebte Ziel wurde nicht erreicht, im Gegenteil zeigten die erhaltenen Präparate eine um $\frac{1}{4}$ verminderte

¹⁾ Journ. Chem. Soc., Bd. 93, S. 217, 1908.

²⁾ Proc. Roy. Soc., Bd. 82, S. 645, 1910.

³⁾ Wochenschr. f. Brauerei, 1884, Nr. 16, 26, 46.

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 35, S. 1703, 1902.

Gärkraft gegenüber der Dauerhefe, die zur Kontrolle aus der nicht behandelten Hefe hergestellt worden war. «Als aber unter Benutzung der Angaben von M. Delbrück, Lange, König und Haymann¹⁾ die regenerierte Hefe in abgepreßtem Zustande einige Stunden bei niedriger Temperatur gelagert, und dann erst auf Dauerpräparat gearbeitet wurde, war in dem einen Fall eine Steigerung der Gärwirkung gegenüber dem Dauerpräparat aus der nicht regenerierten Hefe um 21% eingetreten, im anderen Falle wenigstens der Gärwirkung des Kontrollpräparates wieder erreicht worden.»

Sehr eingehende Versuche über die Regeneration sind 1907 von H. Lange²⁾ mitgeteilt worden, welche einen wesentlichen Abschnitt der von Delbrück veranlaßten Untersuchung über den physiologischen Zustand der Hefe bilden. Lange behandelt seine Hefe mit einer Lösung von Asparagin und Kaliumphosphat, mit und ohne Zusatz von Zucker, und findet Anreicherung an Zymase zwischen 30 und 100%. Wie auch Buchner und Klätte³⁾ in einer Besprechung von Langes Untersuchungen hervorheben, traten abnorme Steigerungen der Gärwirkung auf das 7—8fache nur dann auf, wenn der Zymasenvorrat im Ausgangsmaterial ein sehr geringfügiger war. Mit diesen Resultaten stehen auch die Versuche von Buchner und Klätte im Einklang, und es muß somit als feststehend betrachtet werden, daß man durch das Regenerieren der Hefe ihren Zymasengehalt nicht über das sonst bekannte Maß hinaus steigern, sondern nur den verloren gegangenen auf die gewöhnliche Höhe zurückbringen kann.

Dieses Resultat ist an gewissen Bierhefen gewonnen; man wird es nicht ohne weiteres auf andere Hefen ausdehnen dürfen; denn in solchen Zeiten, wie die zur Regeneration angewandten (4—10 Stunden), tritt in anderen Fällen, z. B. bei unseren Versuchen an Galaktose, unzweifelhaft eine Enzymvermehrung über das ursprüngliche Maß hinaus ein.

¹⁾ Jahrb. d. Versuchs- und Lehranst. f. Brauerei, Bd. 4, S. 158, 298, 1901.

²⁾ Wochenschr. f. Brauerei, Bd. 24, S. 417, 1907.

³⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 9, S. 415, 1908.

Die bis jetzt vorliegenden Literaturangaben zusammenfassend, wird man sagen können, daß die Gewöhnung von Mikroorganismen an ungewohnte Nahrung und eine damit zusammenhängende Veränderung des Enzymgehaltes festgestellt ist.¹⁾

Andererseits ist dieses qualitative Ergebnis das einzige, welches wir bis jetzt besitzen. Unter welchen Umständen, bis zu welchen Grenzen Mikroorganismen dieser Anpassung fähig sind, vor allem ob Fälle vorkommen, in welchen Enzyme, welche noch gar nicht vorhanden waren, in einer lebenden Zelle künstlich erzeugt werden können, mit welchen Eigenschaften die Anpassungsfähigkeit der Zellen verknüpft ist, über alle diese Fragen ist bis jetzt so gut wie nichts bekannt.

Bildungsgeschwindigkeit der Galaktase.

Zu den folgenden Versuchen wurde die Hefe H der hiesigen St. Eriks-Brauerei angewandt, und zwar teils Hefe, welche direkt dem Reinzuchtapparat entnommen war, teils frische Betriebshefe. Die Hefe wurde gewaschen und zur Ermittlung der ursprünglichen Gärkraft sofort untersucht, und zwar sowohl in bezug auf die Vergärung der Glukose wie auf diejenige der Galaktose.

Zur Anpassung wurde die Hefe in folgender Weise behandelt:

Etwa 2 g der abgepreßten Hefe wurden in 200 ccm sterilisierter Lindnerscher Nährlösung eingetragen, welche folgende Zusammensetzung hatte:

- 0,25 g Magnesiumsulfat
- 5,0 » Orthomonokaliumphosphat
- 4,0 » Asparagin
- 20,0 » Zucker.

In dieser Lösung wurde die Hefe bei Zimmertemperatur unter zeitweiligem Umschütteln sich selbst überlassen. Nach einer gewissen Zeit wurde die Nährlösung von der Hefe abdekantiert, diese selbst gewaschen und auf Ton getrocknet. Der zurückbleibende Wassergehalt wurde jedesmal durch Trocknen der Hefe bei 90° ermittelt.

¹⁾ Vgl. auch H. Pringsheim, Variabilität niederer Organismen, Berlin 1910.

Die so vorbehandelte Hefe wurde zur Bestimmung der Gärkraft verwendet.

Die Gärung wurde volumetrisch verfolgt. In 25 ccm 5%iger Galaktoselösung befanden sich 0,5 g vorbehandelte Hefe in kleinen Erlenmeyer-Kölbchen, welche durch Kapillarröhren mit Glasbüretten verbunden waren. Die Entwicklung der Kohlensäure geschah unter Unterdruck von etwa 100 mm Quecksilber, vor den Ablesungen wurde geschüttelt, so daß eine Übersättigung an Kohlensäure sicher vermieden war. Die Temperatur der Gärung betrug 30°, sie ist für jede einzelne Versuchsreihe angegeben. Die vorbehandelte Hefe wurde auf Ton bis auf einen Feuchtigkeitsgehalt von 70—75% getrocknet. Die Angaben der Tabellen sind auf einen Feuchtigkeitsgehalt von 72% (= 28% Trockengehalt reduziert).

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse von 4 Versuchsreihen mitgeteilt. Die erste derselben ist als Vorversuch zu betrachten; bei derselben kam «gereinigte Galaktose», ohne weitere Reinigung zur Anwendung. Die Serie II und III ist mit dem reinsten Kahlbaumschen Präparat, «Galaktose Kahlbaum», ausgeführt, bei der Serie IV wurde die gereinigte Galaktose mit frischer Hefe versetzt (10 g Hefe auf 500 ccm Lösung), um die Verunreinigung durch Glukose zu entfernen. Es hat sich gezeigt, daß in diesem Falle die Gärung der nicht vorbehandelten Hefe am geringsten war; sie betrug wenig mehr, als der Selbstgärung der Hefe entspricht. Jedenfalls geht aus den Zahlen der zweiten Spalte der folgenden Tabelle hervor, daß die Fähigkeit unserer Hefe, Galaktose zu vergären, vor der Anpassung sehr gering ist.

Galaktose. Versuch Ia. Gärungstemp. 30°.

Minuten	Frische Hefe	Vorbehandelt			
		39 Std.	62 Std.	86 Std.	112 Std.
60	4,5	10	12,8	13	10,5
120	8	20,5	25	26	23
180	9	30,5	38,5	40,5	37
240	10	40	54	55	53
300	10,5	49	67	70	66
360	11,2	59	80	85	80

Glukose. Versuch Ib. Gärungstemp. 30°.

Minuten	Frische Hefe	Vorbehandelt		
		39 Std.	62 Std.	86 Std.
60	21	20	20	18,5
120	54	45	44	39,5
180	76	64	63	58
240	104	84	85	79
300	129	104	108	99
360	152	122	124	118

Galaktose. Versuch II. Temp. 30,4°.

Minuten	Frische Hefe	Vorbehandelt		
		16 Std.	24 Std.	45 Std.
60	4,2	6	8	12
120	5,5	10,5	16	26
180	6,1	14	21	39
240	6,3	17,5	27	53
300	6,5	21	34	65,5
360	—	24	39,5	88,5

Galaktose. Versuch IIIa. Temp. 30,6°.

Minuten	Frische Hefe	Vorbehandelt				
		4 Std.	10,5 Std.	22 Std.	37,5 Std.	92 Std.
60	3,9	5,0	6,0	7,2	9,5	11
120	5,4	7,3	9,6	14	18	24
180	6,0	8,7	12,3	21	26	43
240	6,3	—	15,2	32	37	63
300	6,8	—	—	44	46	78

Glukose. Versuch III b. Temp. 30,6°.

Minuten	Frische Hefe	Vorbehandelt			
		10,5 Std.	22 Std.	37,5 Std.	92 Std.
60	24	24,5	22	23	21
120	56	52,5	48	52	46
180	84	79	77	80	71
240	108,5	105	102	104	93
300	136,5	—	127	132	118,5

Galaktose. Versuch IV. Temp. 30,8°.

Minuten	Frische Hefe	Vorbehandelt			
		4 Std.	21 Std.	39 Std.	93 Std.
60	1,8	2,5	7,1	8,5	9
120	2,7	3,9	14,5	17,5	22
180	3,0	5,0	26,5	29	38
240	3,2	6,2	41,5	44,5	58
300	3,4	7,5	53	56	69

Galaktose. Temp. 30°. Temperatur d. Vorbehandlung: 10—11°.

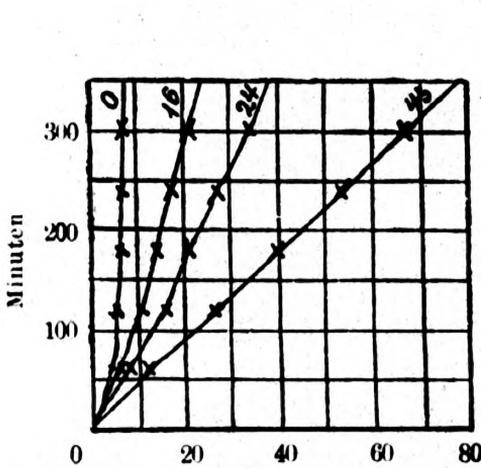
Minuten	Frische Hefe	Vorbehandelt					
		4 Std.	18 Std.	26 Std.	45 Std.	92 Std.	143 Std.
60	3,0	3,3	3,8	4,5	6,5	9,7	10,1
120	3,7	4,5	4,8	6,5	12,5	19	21,5
180	4,4	5,0	5,6	8,9	19,5	32	35
240	4,8	5,4	6,7	11,8	30,5	45,4	49
300	5,1	—	8,3	—	41,5	—	—

Glukose. Temp. 30°. Temperatur d. Vorbehandlung: 10—11°.

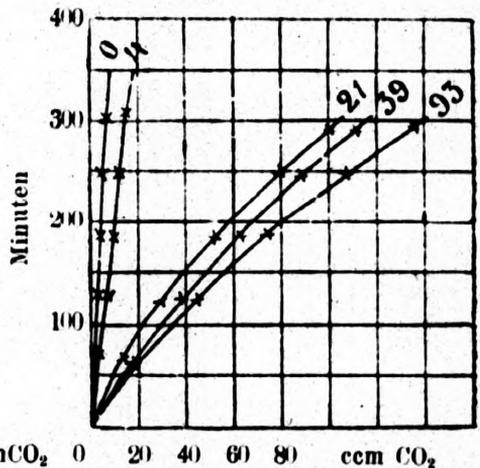
Minuten	Frische Hefe	Vorbehandelt				
		18 Std.	26 Std.	45 Std.	92 Std.	143 Std.
60	23,5	24	25	22,5	22	22
120	54	53	52	53	45	49
180	79	76	78	77	67	74
240	104	102	103	102	92	98
300	131	128	—	126	—	—

Die folgenden Figuren 1 und 2 geben eine Übersicht über die beiden besten Versuchsreihen II und IV.

Der Bestimmung der Vorbehandlungszeiten haftet insofern eine gewisse Unsicherheit an, als man annehmen könnte, daß während der Ausführung der Gärungsversuche zur Bestimmung des Galaktasegehaltes¹⁾ eine Anpassung stattfindet. Es wurde deshalb untersucht, wie groß der Einfluß einer Vorbehandlung mit reiner Galaktoselösung, also in Abwesenheit der übrigen Bestandteile der Nährlösung, ist. Um diesen Anpassungsversuch mit den Gärungsversuchen ganz vergleichbar zu machen, kam eine 5%ige Galaktoselösung zur Anwendung.



Die Ziffern 0, 16, 24 und 45 bedeuten die Zeit der Vorbehandlung in Stunden.
Fig. 1.



Die Ziffern 0, 4, 21, 39 und 93 bedeuten die Zeit der Vorbehandlung in Stunden.
Fig. 2.

Die Tabellen A und B des Versuches V zeigen, daß die Anpassung ganz bedeutend langsamer geschieht, wenn die Zuckerlösung stickstoff- und salzfrei ist; die Anpassung erfolgt dann so langsam, daß die Gärungszeit gegenüber der Vorbehandlungszeit nicht in Betracht kommt.

¹⁾ Wodurch die Fähigkeit der Hefe, Galaktose zu vergären, bedingt wird, ob ein besonderes Enzym, welches die Galaktose in eine andere Hexose verwandelt, dazu erforderlich ist, steht bis jetzt noch nicht fest. Wir bezeichnen also hier einstweilen der Kürze wegen als Galaktase denjenigen enzymatischen Bestandteil der Hefe, welcher die Vergärung der Galaktose ermöglicht.

Versuch V.

A.

Minuten	Frische Hefe	Vorbehandelt 4 Stunden	
		2% Galaktose mit Nährlösung	5% Galaktose ohne Nährlösung
60	1,8	2,5	2,4
120	2,7	3,9	3,5
180	3,0	5,0	4,0

B.

Minuten	Frische Hefe	Vorbehandelt 45 Stunden	
		2% Galaktose mit Nährlösung	5% Galaktose ohne Nährlösung
60	4,2	12	5,9
120	5,5	26	10,1
180	6,1	39	13,1
240	6,3	53	14,8
300	6,5	65,5	18

Dieses Ergebnis scheint uns an und für sich bemerkenswert. Es deutet darauf hin, daß die Anpassung wenigstens der Hauptsache nach an die Neubildung von stickstoffhaltiger Substanz geknüpft ist. Es ist hiernach wahrscheinlich, und damit stehen auch alle anderen Versuchsergebnisse im Einklang, daß Änderungen des Enzymgehaltes wie die hier gefundenen unter Neubildung von Zellen also im Verlauf mehrerer Generationen eintreten.

Die Versuche VI und VII wurden angestellt, um zu ermitteln, ob die Anpassung der Hefe an Galaktose bei darauffolgender Kultur in Glukoselösungen konstant bleibt, bzw. in welcher Zeit diese Anpassung wieder verschwindet.

In Versuch VI wurde die Hefe wie gewöhnlich mit 2% Galaktose enthaltender Nährlösung und zwar 94 Stunden vorbehandelt; in dieser Zeit war also sicher das Maximum des Galaktasegehaltes erreicht. Die hierauf der Galaktoselösung entnommene Hefe wurde gewaschen und in eine 2% Glukose enthaltende Nährlösung eingetragen, in welcher sie 4 Stunden verblieb.

Versuch VI.

Zeit Min.	Mit Galaktose 92 Std. vor- behandelte Hefe		Mit Galaktose 94 Std. und hierauf mit Glukose 4 Std. vorbehandelte Hefe.	
	Gärung in		Gärung in	
	Galaktose a ccm CO ₂	Glukose b ccm CO ₂	Galaktose a ccm CO ₂	Glukose b ccm CO ₂
60	11	21	12	22,5
120	24	46	22	38
180	43	71	36	56
240	63	93	51	70
300	78	118,5	65	96
	$\frac{b}{a} = 1,50$		$\frac{b}{a} = 1,48$	

Versuch VII.

Zeit Min.	Mit Galaktose 92 Std. vor- behandelte Hefe		Mit Galaktose 92 Std. und hierauf mit Glukose 71 Std. vorbehandelte Hefe	
	Gärung in		Gärung in	
	Galaktose a ccm CO ₂	Glukose b ccm CO ₂	Galaktose a ccm CO ₂	Glukose b ccm CO ₂
60	11	21,5	6,3	18
120	24	46	12,5	34
180	43	71	21	51
240	63	93	31	68
300	78	118,5	40	85
	$\frac{b}{a} = 1,50$		$\frac{b}{a} = 2,12$	

In Versuch VII dauerte die Vorbehandlung mit Galaktose ebenfalls 92 Stunden, die hierauf folgende Glukosebehandlung 71 Stunden.

Die Versuche zeigen, daß die Anpassung auch nach längerer Kultur in der ursprünglichen Nährlösung in recht hohem Grade erhalten bleibt.

Die Geschwindigkeit, mit welcher lebende Hefe Kohlensäure aus Zucker entwickelt, läßt sich bekanntlich nicht durch eine Konstante erster Ordnung ausdrücken. Will man also die Vergärungskraft verschiedener Hefen vergleichen, so wird man entweder die Zeiten vergleichen, in welchen eine gewisse Anzahl Kubikzentimeter CO_2 entwickelt wurde, oder die in der Zeiteinheit entwickelte Anzahl Kubikzentimeter CO_2 . Will man den Einfluß von Nebenwirkungen, welche mit fortschreitender Reaktionsdauer zunehmen, möglichst eliminieren, so wird man, besonders in unserem Fall, letzteres vorziehen; bleibt die Anzahl entwickelter Kubikzentimeter CO_2 klein gegen diejenige, welche überhaupt entwickelt werden kann, so wird man die so gemessene Geschwindigkeit mit der katalysierenden Kraft der Hefe und also, bei gegebener Hefemenge, mit der Menge des darin enthaltenen entsprechenden Enzyms proportional setzen dürfen.

Die folgenden Kurven geben also indirekt die Abhängigkeit des Galaktosegehaltes der Hefe von der Dauer der Vorbehandlung an.

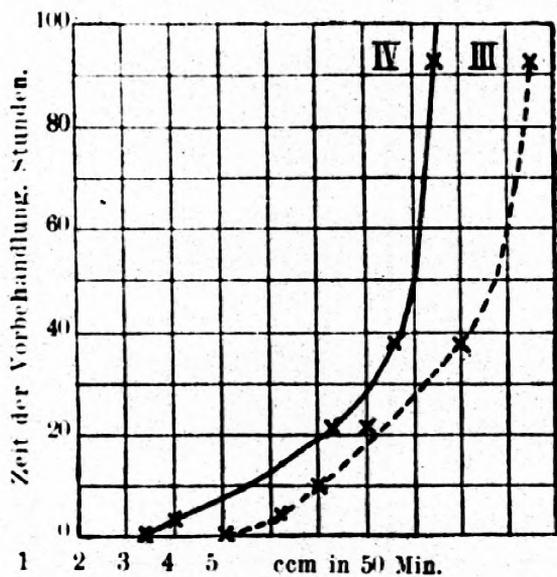


Fig. 3.

Wie aus den Kurven der Figuren 3 und 4 hervorgeht, ist die Geschwindigkeit, mit welcher eine Hefe die Fähigkeit der Galaktosevergärung ausbildet, eine unter gegebenen Umständen reproduzierbare und meßbare Größe. In bezug auf diese Fähigkeit erreicht die Hefe nach einiger Zeit einen Grenzwert, welcher bei weiterer Kultur im gleichen Medium

nicht mehr überschritten wird.

Die Geschwindigkeit der Enzyymbildung scheint anfangs verzögert zu sein; man wird anzunehmen haben, daß in dieser Periode eine Hemmung beseitigt oder eine katalysierende Sub-

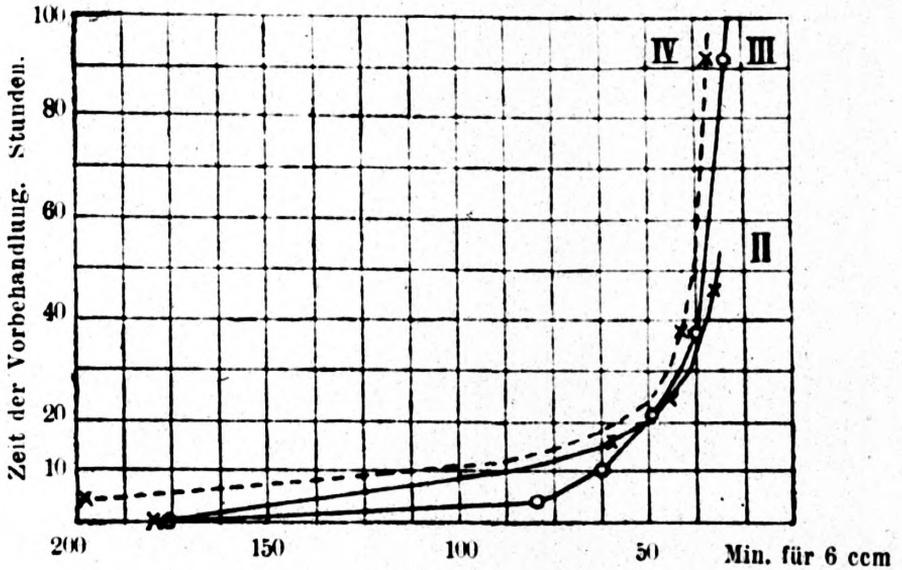


Fig. 4.

stanz gebildet wird. Der erste Teil der Anpassungskurven soll noch eingehend untersucht werden. Bis derselbe aufgeklärt ist, wird man als Anpassungsgeschwindigkeit diejenige Zeit bezeichnen, welche ein Organismus braucht, um von einem Normalzustand aus die Hälfte der unter den betreffenden Umständen erreichbaren enzymatischen Fähigkeit zu erlangen.

Die Anpassungsgeschwindigkeit dürfte eine für Organismen nicht unwichtige Konstante darstellen, und man wird zunächst zu ermitteln suchen, mit welchen anderen meßbaren physiologischen Eigenschaften diese Konstante in Zusammenhang steht. Zeigt es sich, daß gewisse Organismen sich allgemein durch hohe Anpassungsgeschwindigkeiten verschieden äußeren Einflüssen gegenüber auszeichnen, so wird man in diesen Geschwindigkeiten ein Maß für die Eigenschaft finden, welche zuweilen als Vitalität bezeichnet wurde.

Wir sind damit beschäftigt, den Einfluß der Temperatur und der Konzentration der Nährlösung auf die Anpassungsgeschwindigkeit zu messen, und möchten uns bis dahin die Diskussion unserer Versuchsergebnisse vorbehalten.