

Über das Reduktionsvermögen der Hefe. Hydrogenisation des Schwefels bei der Alkoholgärung.

Von
M. A. Chowrenko.

Mit einer Abbildung im Text.

(Aus dem Pflanzen-physiologischen Laboratorium von Prof. N. Chudjakow des
Moskauer Landwirtschaftlichen Instituts.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. Juli 1912.)

Einleitung.

Schon Nessler¹⁾ im Jahre 1869, dann Dumas²⁾ im Jahre 1874 stellten fest, daß während der Alkoholgärung bei Anwesenheit von Schwefel durch Hefe Schwefelwasserstoff entsteht. Das ist eine gutbekannte Tatsache in der Praxis der Gärungsindustrie, besonders bei der Weinbereitung, denn der gärende Weinmost enthält oft bedeutende Mengen von Schwefel, welcher beim Weinbau als Heilmittel gegen Pilzkrankheiten angewendet wird. A. Osterwalder³⁾ wies darauf hin, daß es Heferassen gibt, welche H_2S nur bei Anwesenheit von freiem Schwefel bilden, und andere, die auch Schwefel in gebundener Form reduzieren. Stagnitta-Balistreri⁴⁾ stellt fest, daß nicht nur Hefe, sondern auch einige Mycoderma-Arten diese Reduktionsfähigkeit besitzen. Viele Forscher, wie Fr. Pfeifer, B. Haas, J. Klaudi und A. Svoboda, Ed. Hotter u. a. (siehe Hand-

¹⁾ Julius Nessler, Die Bereitung, Pflege und Untersuchung des Weines. 1898, Stuttgart.

²⁾ Dumas, Recherches sur la fermentation alcoolique. Annales de Chimie et de physique. 5^e sér., T. III, p. 22.

³⁾ Landw. Jahrb. der Schweiz, 1902, Bd. 16, S. 498.

⁴⁾ Arch. f. Hyg., 1893, Bd. 16, S. 10.

buch der Technischen Mycologie von Fr. Lafar, 4. Band, S. 449) fanden unter den Gärungsprodukten verschiedener Gärstoffe schweflige Säure, als Ergebnis der Hefereduktion.

J. Rey-Pailhade¹⁾ betonte als erster, daß Hydrogenisation des Schwefels ein Prozeß enzymatischen Charakters sei und daß das Ferment, welches Schwefelwasserstoff aus Schwefel bildet (das Philothion), aus der Hefe in den Alkoholauszug übergeht, wenn gepreßte Bierhefe mit 86% Alkohol in gleichen Gewichtsmengen (1 : 1) behandelt wird. Der Rey-Pailhadesche Alkoholauszug hydrogenisiert den Schwefel bei gewöhnlicher Temperatur, seine maximale Wirkung aber zeigt sich bei 35–40° C.; außerdem reduziert er Indigokarmin. Das Ferment des Alkoholauszugs, von Rey-Pailhade anfangs Philothion, dann Hydrogenase²⁾ genannt, oxydiert sich leicht beim Stehen an der Luft im Laufe von 2–3 Tagen, wobei es seine Reduktionsfähigkeit einbüßt.

Pozzi-Escot³⁾ wiederholte in seinen zahlreichen Versuchen die Versuche von Rey-Pailhade, bestätigte die erzielten Resultate und kam zu dem Schlusse, daß das Philothion eine Mischung von wenigstens 2 selbständigen Fermenten ist, von denen das eine gegen Oxydation widerstandsfähiger ist als das andere. Außerdem vermutet er, daß die Löwsche Katalase und die Rey-Pailhadesche Hydrogenase ein und dasselbe Ferment seien. Pozzi-Escot nennt dasselbe Reduktase und weist darauf hin, daß es sich in allen Organen verschiedener in der Wachstumsperiode stehender Pflanzen vorfindet.

Schreiner und Sullivan⁴⁾ beobachteten in der Tat die Reduktion von selenig- und tellurigsurem Natrium durch junge Wurzeln des Weizens, wobei es sich ergab, daß mit der Zunahme an Wuchs auch die Reduktionskraft der Würzelchen

¹⁾ J. de Rey-Pailhade, Sur un corps d'origine organique hydrogénant le soufre à froid. C. R. de l'Ac. de Sc., 11 juin 1888.

²⁾ Bull. Soc. Chim., 1900, Bd. 23, S. 666.

³⁾ Pozzi-Escot, Etat actuel de nos connaissances sur les oxydases et les réductases. 1902, Paris.

⁴⁾ O. Schreiner und M. Sullivan, «Reduction by roots», Bot. Gazette, 1911, Bd. 51, H. 2, S. 120–130.

wächst und zwar bis zum 8. Tage, danach nimmt sie ab. In Wasser gekochte Wurzeln verlieren die Reduktionsfähigkeit. Zur Erhaltung wirksamerer Hefepräparate schlägt Pozzi-Escot vor, untergärrige Bierhefe zu benutzen, die im Vergleiche zu Oberhefe an Reduktase reichhaltiger ist, und rät, anstatt des alkoholischen Auszugs eine Plasmolyse der Zellen durch Pulverzucker zu vollziehen. Durch Benutzung stark aktiver Lösungen rief Pozzi-Escot die Hydrogenisation des Selens und die Reduktion des Nitrobenzols zu Anilin hervor.

M. Hahn¹⁾ prüfte das Reduktionsvermögen des Buchnerschen Preßsafts durch Anwendung von Methylenblau, wobei es sich erwies, daß frischer Saft, nach Hinzufügung von Toluol in einem Eisschrank aufbewahrt, erst nach einigen Tagen die Reduktionsfähigkeit verliert, wogegen ein bloß stundenlanges Erwärmen bei 55—60° C. den Verlust derselben nach sich zieht. Die Optimaltemperatur für Reduktion von Methylenblau liegt bei 40° C. (zufolge Pozzi-Escot bei 30—40° C.).

A. Nastucoff²⁾ beobachtete die Reduktion des Magnesiumsulfats durch verschiedene Hefearten bei Anwesenheit von basischem Wismutnitrat. Der dabei entstehende braunschwarze Niederschlag von Schwefelwismut diente als Maß für die Intensität der Hefereduktion. Der Verfasser fand, daß die verschiedenen Heferassen eine verschiedene Reduktionskraft aufweisen, doch irgend einen Zusammenhang zwischen dem Reduktionsprozesse und der Alkoholgärung entdeckte er nicht.

Bei seinen Versuchen mit Zymin fand W. Palladin,³⁾ daß die Reduktase der Hefe einen unmittelbaren Anteil an der Spaltung der Glukose in Alkohol und CO₂ hat, da in den Fällen, wo die Glukose sich neben selenigsaurem Natrium befindet, das letztere solange unberührt bleibt, bis die Zuckerspaltung vor sich geht, ist aber dieselbe beendet, so beginnt die Reduktion des Selens. Diese Reaktion findet überhaupt nicht

¹⁾ M. Hahn, Münchener med. Wochenschrift, 1902, S. 595.

²⁾ Al. Nastucoff, Essais sur le pouvoir réducteur des levures pures, moyens de le mesurer. Ann. de l'Institut Pasteur, 1895, S. 766.

³⁾ W. Palladin, Beteiligung der Reduktase im Prozesse der Alkoholgärung. Diese Zeitschrift, 1908, Bd. 56, S. 81.

statt, wenn das Zymin vorher gekocht ist. Befinden sich aber in der selenigsauren Natriumlösung verschiedene nicht vergärbare organische Stoffe, so wird die Reduktion nicht gehemmt.

Diese von W. Palladin erlangten Resultate, welche eine wichtige Bedeutung zur Aufklärung des Wesens des biochemischen Prozesses der Alkoholgärung haben, finden ihre Bestätigung auch in der von mir angestellten Untersuchung der Hydrogenisation des Schwefels. Meine Versuche habe ich mit lebender Hefe sowie auch mit Zymin ausgeführt, wobei ich folgende Fragen zu beantworten hatte:

1. Entsteht Schwefelwasserstoff bei der Alkoholgärung in Anwesenheit des Schwefels, wenn Reinzuchthefer und sterile Gärböden angewendet werden? 2. In welchem Verhältnisse stehen die Hydrogenisation des Schwefels und der Prozeß der Alkoholgärung zu einander? 3. Welchen Einfluß auf Hydrogenisation des Schwefels haben — verschiedene Hefearten, der Luftzutritt oder Luftabwesenheit während der Gärung, sowie Giftstoffe, welche dem Gärboden zugesetzt sind? 4. Wird der Schwefel durch Zymin hydrogenisiert?

Methode.

Behufs einer quantitativen Bestimmung des Schwefelwasserstoffs benutzte ich ein Gemisch von Bromwasser und Salzsäure; die bei der Oxydation erhaltene Schwefelsäure wurde durch gewichtsanalytisches Verfahren als Baryumsulfat bestimmt. Die oxydierende Mischung wurde in eine Drechselflasche mit gut eingeschliffenem Pfropfen eingeführt. Es ergab sich aus dem Versuche, daß eine solche Flasche vollkommen genügt, denn, nach Einschaltung einer zweiten derartigen Flasche, konnte ich darin keine Spuren von Schwefelsäure entdecken, selbst nicht in der Zeit der stärksten Entwicklung von Schwefelwasserstoff.

Zur Verhütung einer zufälligen Übertragung von Schwefelsäure, welche sich in den Kautschukverbindungen der Bromflasche mit den Nebengefäßen bilden könnte, hatten seine Ableitungsrohre besondere Sicherheitskugeln. Die Gärung voll-

zog sich in großen dickwandigen Kolben, von konischer Form, mit seitlich angesetztem Rohr. In den Hals des Kolbens wurde ein mit Watte umwickelter und mit einer Glasröhre versehener Pfropfen eingefügt. Beide Rohre des Kolbens waren mit Glasrohren von 30—40 cm Länge verbunden, welche bis auf $\frac{3}{4}$ mit Watte angefüllt waren. Bei allen Versuchen wurde in die Kolben je ein Liter Bierwürze gegossen und je 1 g Schwefel in Form von Schwefelblume hinzugetan, danach die Kolben sterilisiert. Der Versuch ergab, daß während des Erwärms beim Sterilisieren sich aus Bierwürze und Schwefel kein Schwefelwasserstoff bildet. Die Gärung geschah mit auf folgende Art zubereiteter Reinhefe; in kleine Freudenreichsche Kolben wurde zu 20 ccm Bierwürze gegossen und nach Sterilisation, einen Tag vor Beginn des Versuchs die Impfung mit Hefe aus Gelatinekultur unternommen.

Die geimpften Kolben wurden darauf in den Thermostaten bei 25° C. gestellt. Nach Verlauf von 24 Stunden war schon eine starke Gärung der Bierwürze zu bemerken. Aus einer ganzen Reihe derartiger Kolben konnte man immer die nötige Anzahl solcher auswählen, welche dem äußeren Anscheine nach denselben Gärungsgrad besitzen. Die durchgeschüttelte gärende Flüssigkeit wurde unter gewöhnlicher bakteriologischer Vorsichtsmaßnahme rasch in einen großen Kolben mit Bierwürze umgegossen, der mit Watte umwickelte Pfropfen darauf in den Hals des Kolbens gezwängt, so daß der Rand des Kolbens den Pfropfen überragte, und in die so entstandene Vertiefung geschmolzener Siegelack bis zum Rande gegossen. Bei solcher Zuführung der Hefe begann der Gärungsprozeß in allen Versuchskolben rasch und zu gleicher Zeit.

Zum Durchziehen der Luft und der Kohlensäure diente eine Motorpumpe und die Verdünnung erreichte man bei beliebiger Zeitdauer.

Die Luft, sowie CO₂, wurden vor dem Eintritt in die Gärflüssigkeit durch 5%ige Lösung von schwefelsaurem Kupfer und darauf durch eine Drehselsche Waschflasche mit destilliertem Wasser gereinigt. Die durch einen Gasstrom entführten Bromdämpfe wurden mit Natriumhyposulfit absorbiert.

Versuch 1.

Bierhefe.¹⁾

Die Gärung ging ohne Luftzutritt vor sich, und zur Entziehung des entstandenen Schwefelwasserstoffs wurde ein Strom von Kohlensäure durchgelassen. Die ganze Versuchsdauer war in 7 Zeitperioden geteilt. Nach Verlauf jeder Periode wurde das Glas mit Bromwasser durch ein anderes ebensolches ersetzt, während das vorher gebrauchte der Analyse unterzogen wurde.

Die nachfolgende Tabelle gibt die Quantität des erhaltenen Baryumsulfats und des daraus berechneten Schwefelwasserstoffs für jede einzelne Periode an:

Tabelle 1.

Perioden	Dauer des Versuchs Tage	BaSO ₄ in g	H ₂ S in g
1	6	0,0509	0,0074
2	7	0,1366	0,0199
3	6	0,0949	0,0138
4	6	0,0217	0,0032
5	6	0,0136	0,0020
6	12	0,0058	0,0008
7	32	0,0023	0,0003
Total:	75	0,3258	0,0474

Wie Tabelle 1 zeigt, hatte sich die größte Menge von Schwefelwasserstoff, fast 72% der Gesamtmenge, im Laufe der 2. und 3. Periode gebildet, und zwar fällt die Maximaldase in die zweite Periode, danach folgen der Reihe nach die 3., 1., 4. und die übrigen. Da der Hauptgärprozeß die ersten 5 bis 6 Tage vor sich geht, so ist es klar, daß die intensivste Bildung von Schwefelwasserstoff nach Beendigung des Gärungsprozesses stattfindet. In den darauffolgenden Perioden nimmt der Prozeß verhältnismäßig schnell ab und nach Monatsfrist (32 Tage) hatten sich bloß 3 dmg Schwefelwasserstoff angesammelt.

¹⁾ Eine Rasse der Moskauer Trechgorny Bierbrauerei.

Versuch 2.

Preßhefen.

Der Versuch wurde in zweierlei Richtungen ausgeführt: in dem einen Kolben, wie beim ersten Versuche, ohne Luftzutritt, in einem Strome von Kohlensäure; in dem anderen unter fortwährendem Durchziehen der Luft durch die Gärflüssigkeit. In der Periode der Hauptgärung mußte infolge reichlicher Aussonderung von CO_2 der Luftstrom gemäßigt werden, und demnach konnten die Bedingungen, unter denen sich die Hefe befand, nicht für streng aerob gelten; doch vor und nach der genannten Periode trat der Unterschied in den Lebensbedingungen der Hefe viel schärfer hervor, besonders, nachdem der Gärungsprozeß geendet hatte. Das Durchziehen von Kohlensäure und Luft geschah während der ganzen Versuchsdauer Tag und Nacht mit Unterbrechungen zur Auswechslung der Bromgläser bei Abschluß jeder Periode oder zur Hinzufügung frischer Bromportionen, wenn der im Bromwasser befindliche Bromgehalt sich verminderte. Die ganze Versuchsdauer wurde in 5 Perioden geteilt. Tabelle 2 zeigt die Mengen des in beiden Kolben für jede Periode gewonnenen Schwefelwasserstoffs.

Tabelle 2.

Perioden	Dauer des Versuchs Tage	Im CO_2 -Strom		Im Luftstrom	
		BaSO_4 in g	H_2S in g	BaSO_4 in g	H_2S in g
1	4	0,0347	0,0051	0,0580	0,0085
2	4	0,1005	0,0147	0,0368	0,0054
3	4	0,0433	0,0063	0,0117	0,0017
4	5	0,0243	0,0035	0,0060	0,0009
5	10	0,0255	0,0037	0,0035	0,0005
Total:	27	0,2283	0,0333	0,1195	0,0175

Wenn wir die Menge des in der 4. und 5. Periode im Laufe von 4 Tagen erhaltenen Schwefelwasserstoffs berechnen, indem wir jede Periode auf die gleiche Zeiteinheit reduzieren, so haben wir eine genaue Vorstellung von dem Charakter des

schwefelwasserstoffbildenden Prozesses bei zwei Fällen dieses Versuches.

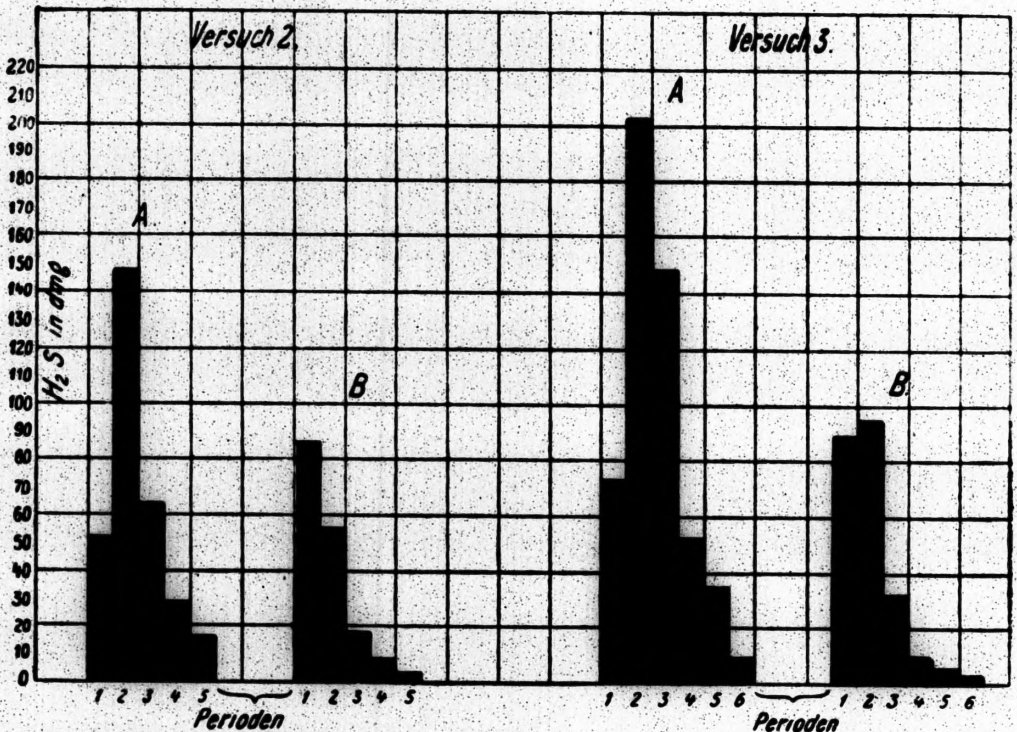
H_2S -Mengen auf 4 Tage berechnet in dmg.

Perioden	In Kohlensäure	Im Luftstrom
1	51	85
2	147	54
3	63	17
4	28	7,2
5	14,8	2,0

Diagramme des Entwicklungsganges von H_2S bei der Alkoholgärung.

A. Im CO_2

B. Im Luftstrom.



Ich veranschauliche die erhaltenen Zahlen durch Diagramme. A stellt den Entwicklungsgang von H_2S im Kohlensäurestrom und B im Luftstrom dar. Die Zahlen der Tabelle 2, sowie die Diagramme zeigen, daß beide H_2S -Bildungsprozesse verschieden vor sich gehen. In dem einen Falle (in Kohlensäure) entsteht das Maximum in der 2. Periode, worauf der Reihe nach die 3., 1., 4., 5. folgen, in dem anderen Falle (in

Luft) fällt das Maximum in die 1. Periode, in die Zeit der stärksten Gärung. Während in CO_2 die 2. Periode sich durch reichliche Abscheidung von H_2S , dessen Menge plötzlich von 51 bis auf 147 dmg steigt, charakterisiert, verringert sich in Luft in derselben Periode die H_2S -Bildung von 85 auf 54 dmg.

In der 3. Periode bemerkt man eine Verminderung auch in Kohlensäure, doch verläuft sie weniger rasch als in der Luft. In Kohlensäure ist die Gesamtmenge des während der ganzen Versuchszeit gebildeten Schwefelwasserstoffs, sowie die Maximaldase desselben fast zweimal so groß als in der Luft, woraus man schließen kann, daß Luft im allgemeinen keinen günstigen Einfluß auf Entstehung von Schwefelwasserstoff hat, da in derselben nur in der 1. Periode etwas mehr H_2S erzeugt wurde als in Kohlensäure. Der letztere Umstand läßt sich dadurch erklären, daß die reichliche Abscheidung von CO_2 während der stärksten, hauptsächlich in der 1. Periode aufgetretenen Gärung den schädlichen Einfluß des Sauerstoffs der Luft mindern mußte; da, den Versuchsbedingungen nach, der in dieser Zeit leicht aufsteigende Schaum der Gärflüssigkeit die Zuführung eines Luftstroms von nur geringer Stärke gestattete. Andererseits beförderte die eintretende Luft die Vermehrung der Hefe, infolgedessen ihre lebende Masse in diesem Kolben größer war als in dem mit Kohlensäure beschickten.

Versuch 3.

Weinhefen.

In zwei Kolben wurde Bierwürze mittels Reinkultur von unter dem Namen Laureiro bekannter Weinhefe vergoren, durch den einen Kolben ein Luftstrom, durch den anderen Kohlensäurestrom geleitet.

Nachstehende zwei Tabellen geben an: Tabelle 3, die Mengen des gewonnenen BaSO_4 und H_2S ; Tabelle 4, dieselben Mengen von H_2S , jedoch alle auf die Dauer von 4 Tagen berechnet.

Tabelle 3.

Perioden	Dauer Tage	In Kohlensäure		Im Luftstrom	
		BaSO ₄ in g	H ₂ S in g	BaSO ₄ in g	H ₂ S in g
1	4	0,0491	0,0072	0,0609	0,0089
2	4	0,1385	0,0202	0,0645	0,0094
3	4	0,1014	0,0148	0,0217	0,0032
4	5	0,0439	0,0064	0,0078	0,0011
5	10	0,0585	0,0085	0,0092	0,0013
6	14	0,0195	0,0028	0,0059	0,0009
Zusammen:	41	0,4109	0,0599	0,1700	0,0248

Tabelle 4.

H₂S-Mengen auf 4 Tage berechnet in dmg.

Perioden	In Kohlensäure	Im Luftstrom
1	72,0	89,0
2	202,0	94,0
3	148,0	32,0
4	51,2	8,8
5	34,0	5,2
6	8,0	2,5

Vergleichen wir nun diese Tabellen mit denen der vorhergehenden Versuche, so sehen wir, daß in allen Beobachtungsperioden Weinhefe größere Mengen von H₂S bildete als Bierhefe und Preßhefe. Im Vergleich zu Bierhefe ist der Gesamtbetrag des durch Weinhefe gebildeten H₂S in CO₂ um 70%, in der Luft um 41% größer.

Der Charakter der Erscheinung blieb derselbe wie bei den früher angestellten Versuchen. Ein Unterschied ist nur in der 2. Periode im Luftstrom bemerkbar, wo sich eine Vermehrung der entstandenen Schwefelwasserstoffmenge zeigt.

Das Diagramm veranschaulicht beide Prozesse dieses Versuches.

Versuch 4.

Bierhefen in Bierwürze mit 5%iger Glukose.

Da auf Grund der erhaltenen Ergebnisse die wichtigsten Teile des beobachteten Prozesses in der 1., 2. und 3. Periode verlaufen, nämlich die der Hauptgärung, alsdann die unmittelbar danachfolgende und starke Schwefelwasserstoffentwicklung aufweisende, und endlich diejenige, bei der die Verminderung der H_2S -Bildung eintritt, so wurde in diesem Versuche die 2. Periode auf 3 Tage beschränkt, während die 1. Periode diejenige ganze Zeit einnahm, in der äußere Gärungsanzeichen zu bemerken waren, was 6 Tage ausmachte. Die 3. Periode dauerte 5 Tage, also im ganzen 14 Tage. Eben solange währte die 4. Periode (14 Tage). Vergoren wurde Bierwürze mit Beigabe von 5% Traubenzucker; die Hefe war dieselbe wie beim ersten Versuche.

Die Resultate sind in nachfolgender Tabelle angegeben:

Tabelle 5.

Periode	Dauer Tage	H_2S in g	
		in Kohlensäure	im Luftstrom
1	6	0,0169	0,0463
2	3	0,0708	0,0561
3	5	0,0398	0,0130
4	14	0,0115	0,0010
Zusammen:	28	0,1390	0,1164

Beim Vergleiche dieser Zahlen mit den früher erhaltenen erweist es sich, daß die bei diesem Versuche gewonnene Gesamtschwefelwasserstoffmenge alle vorhergehenden übertrifft. Weiter folgt die Reihenfolge der Zahlen, welche sich auf ungefähr dieselben Zeitperioden beziehen.

Hefenarten	Dauer des Versuches Tage	Menge des gebildeten H_2S (in Kohlensäure) in g
Preßhefe	27	0,0333
Bierhefe	25	0,0443
Weinhefe	27	0,0571
Bierhefe in Bierwürze mit 5% Glukose	28	0,1390

Dieser Vergleich ergibt, daß in ein und demselben Nährboden (in Bierwürze) Weinhefe die größte Wirksamkeit in bezug auf Schwefelwasserstoffbildung zeigte, danach Bierhefe und zuletzt Preßhefe. In Bierwürze mit größerem Zuckergehalt, nach Zugabe von 5% Glukose, erzeugte dieselbe Bierhefe die dreifache Quantität von H_2S .

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß das Hydrogenisationsvermögen der Hefe in engem Zusammenhang mit dem Gärungsprozesse steht. Von den drei angewendeten Hefenarten sind Weinhefen die typischsten Erreger der Alkoholgärung, dann Bierhefe und endlich Preßhefe, eine Reihenfolge, die auch bezüglich der Schwefelwasserstoffbildung Gültigkeit hat. Andererseits bildet dieselbe Bierhefe bei Zusatz von Glukose zu dem Nährboden die dreifache Menge von H_2S , wodurch der Gärungsprozeß an Intensität zunahm.

Kehren wir nun zu den beim 4. Versuch erhaltenen Zahlen zurück, so sehen wir, daß die Hauptmenge des Schwefelwasserstoffs während der ersten 14 Tage entstand. In Kohlensäure macht sie 92% und in dem Luftstrom 99,15% der gesamten Kohlensäure aus.

Da in diesem Versuche die unmittelbar nach Abschluß des Gärprozesses eintretende Periode durch 3 Tage scharf definiert ist, so stellt sich der H_2S -Bildungsprozeß klar heraus, wenn man die in den übrigen 3 Perioden gefundenen Zahlen auch auf 3 tägige Dauer berechnet:

Tabelle 6.

Perioden	Menge des in 3 Tagen gebildeten H_2S in dmg	
	in Kohlensäure	im Luftstrom
1	84,5	231,5
2	708,0	561,0
3	238,8	78,0
4	24,6	2,1

Aus diesen Versuchen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Hydrogenisation des Schwefels bei Alkoholgärung ist eine Erscheinung, die allen bei den Ver-

suchen angewendeten Hefenarten eigen ist, wobei die größte Wirksamkeit der Weinhefe zukommt, dann folgt Bierhefe und zuletzt Preßhefe.

2. Mit Erhöhung des Zuckergehaltes der Gärungsflüssigkeit vergrößert sich die Menge des entwickelten Schwefelwasserstoffs.

3. Die Maximalmenge des Schwefelwasserstoffs entsteht nicht während der Gärung, sondern in der unmittelbar danach eintretenden Periode, wonach der Prozeß rasch fällt, besonders in Anwesenheit von Luft.

4. Bei weiterem Zusammenlassen von Hefe und Schwefel erfolgt geringe Ausscheidung von Schwefelwasserstoff, dessen Menge sich in gelüftetem Medium bis zu Spuren vermindert.

5. Ein Luftstrom vergrößert die Ausscheidung des Schwefelwasserstoffs nur in der ersten Periode der Hefeentwicklung und während der Hauptgärung, in den weiteren Stadien hemmt er den Prozeß.

6. Die Gesamtmenge des in Kohlensäure gebildeten H_2S übertrifft bei allen Hefenarten diejenige, welche mittels derselben Hefenart im Luftstrom gewonnen wird.

Versuch 5.

Einfluß des Toluols und Thymols.

Zu diesem Versuch diente Bierwürze mit Zusatz von 10% Traubenzucker und Laureirohefe (eine der große Gär-tätigkeit aufweisenden Weinhefenrassen). Der Versuch wurde in drei Kolben ausgeführt und die ganze Versuchszeit in drei Perioden geteilt. In der ersten Periode, während der Haupt-gärung, blieben alle drei Kolben ohne jeglichen Zusatz und die Gasausscheidung geschah unter eigenem Druck; nach Verlauf von 89 Stunden wurde für 3 Stunden ein Kohlensäurestrom durchgeleitet zur möglichst vollständigen Verdrängung des ganzen Schwefelwasserstoffs. Dann, während der erste Kolben als Kontrollkolben ohne Zusatz blieb, wurde dem zweiten Toluol, und zwar 100 ccm auf 1 l Nährlösung, und dem dritten 20 g

Thymol zugegeben, worauf der Kohlensäurestrom noch etwa eine Stunde lang durchgeleitet wurde. Die ganze erste Periode dauerte demnach 93 Stunden. Nach Auswechslung der Bromgläser begann die 2. Periode, welche 24 Stunden währte, und die dritte endlich nahm 93 Stunden in Anspruch. Folglich wurde die Schwefelwasserstoffentwicklung in diesen zwei Perioden durch die Wirksamkeit von Toluol und Thymol beeinflusst. Die Verdrängung des H_2S aus der Flüssigkeit wurde in allen drei Kolben durch einen Kohlensäurestrom hervorgebracht.

Die Resultate dieses Versuchs stellt folgende Tabelle dar, wo zwecks Zahlenvergleichs die Schwefelwasserstoffmenge in jeder Periode auf 24 Stunden berechnet ist.

Tabelle 7.

Perioden	Dauer Std.	Menge des in 24 Stunden gebildeten H_2S in g		
		I. Kontrollkolben	II. Toluol	III. Thymol
1	93	0,0058	0,0069	0,0071
nach Zuführung der Antiseptika				
2	24	0,0138	0,0036	0,0041
3	93	0,0113	0,0012	0,0010

Im ganzen aber nach Zugabe von Toluol und Thymol, d. i. im Laufe der 2. und 3. Periode (117 St.), hatten sich gebildet:

im Kontrollkolben	0,0578 g H_2S
mit Toluol	0,0048 g H_2S
mit Thymol	0,0052 g H_2S .

Wenn wir nun die Abtötung der Hefe durch die eingeführten Giftstoffe zulassen (geflissentlich waren große Dosen Toluols und Thymols genommen worden, um sie bei Abnahme in der Lösung nach Entführung der Dämpfe durch den Kohlensäurestrom zu ersetzen), so müssen wir anerkennen: 1. daß nach Abtötung der Hefe sich H_2S -Bildung rasch mindert, in Toluol macht die tägliche H_2S -Menge in der 2. Periode 26%, und in Thymol 29% der Kontrollmenge aus; in der 3. Periode fallen diese Zahlen bis auf 10% und 8%; 2. daß in Toluol

und Thymol die Abschwächung des H_2S -Bildungsprozesses bedeutend rascher vor sich geht als in der Kontrollprobe, und zwar läßt sich die Verminderung in den zwei nachfolgenden Perioden in der Kontrollprobe durch das Verhältnis $\frac{138}{113} = 1,2$, in Toluol — $\frac{36}{12} = 3$, in Thymol — $\frac{41}{10} = 4,1$ ausdrücken; 3. daß die Antiseptika keine völlige Einstellung der Schwefelwasserstoffentwicklung hervorgerufen haben.

Versuch 6.

Einfluß des Alkohols.

Die Gärungsflüssigkeit und Hefe waren dieselben wie beim 5. Versuch. Durch zwei Kolben mit je 1 l Bierwürze wurde nach Hefezusatz ein Kohlensäurestrom, durch den 3., ebenso beschickten, ein Luftstrom geleitet. Der Versuch wurde in drei Perioden geteilt — von 26, 48 und 76 Stunden. Nach Verlauf der ersten Periode in den 2. und 3. Kolben durch eine dazu bestimmte Röhre zu 1200 ccm 95%iger Alkohol eingeführt; der erste Kolben diente als Kontrollkolben für den zweiten. Alkohol wurde soviel genommen, daß die Mischung nicht weniger als 50° Alkohol aufwies. In einer solchen Alkoholflüssigkeit konnte von Tätigkeit eines lebendigen Hefeprotoplasmas keine Rede sein. Der Versuch ergab folgende Resultate:

Tabelle 8.

Perioden	Dauer Std.	1. Kolben. Kohlensäure H_2S in g	2. Kolben. Kohlensäure H_2S in g	3. Kolben. Luft H_2S in g
1	26	0,00258	0,00232	0,00420
			nach Alkoholzuführung	
2	48	0,03324	0,00098	0,00115
3	76	0,04946	0,00150	0
Im ganzen während der 2. u. 3. Periode	124	0,08270	0,00248	0,00115

Auf 24 Stunden berechnet ergeben diese Zahlen:

Tabelle 9.

Perioden	H ₂ S in g, entwickelt in 24 Stunden		
	1. Kolben, CO ₂	2. Kolben, CO ₂	3. Kolben, Luft
1	0,00238	0,00214	0,00388
	nach Zugabe von Alkohol		
2	0,01662	0,00049	0,00057
3	0,01562	0,00047	0

Diese zwei Tabellen zeigen eine scharfe Unterbrechung der Schwefelwasserstoffbildung nach Zugabe von Alkohol; in Kohlensäure gewann man im ganzen ungefähr 5 dmg H₂S gegenüber 166 und 156 dmg des Kontrollkolbens, und bei dieser Zahl bleibt die tägliche Durchschnittsmenge des entstandenen H₂S fast konstant während der ganzen Dauer der 2. und der 3. Periode, d. h. im Laufe von 5 Tagen (124 St.). In dem Kolben mit Luft aber wurde in der 2. Periode noch Schwefelwasserstoff in ungefähr derselben Menge wie in der Probe mit Kohlensäure entdeckt, doch schon nach Verlauf von 48 Stunden hörte darin die H₂S-Bildung vollständig auf. Letztere Beobachtung weist darauf hin, daß durch Einfluß der Luft das H₂S bildende Ferment schon in der zweiten Periode, d. h. in nicht mehr als 48 Stunden, seine Wirksamkeit einbüßte, denn nach Verlauf dieser Frist während 76 Stunden hatten sich keine Spuren von Schwefelwasserstoff gebildet.

Auf diese Weise zeigen Versuch 5 und 6:

1. Daß nach Zugabe der Giftstoffe, des Toluols, Thymols und Alkohols die H₂S-Entwicklung fort-dauerte, wenn auch in sehr schwachem Maße; 2. daß Luft nach Verlauf von nicht mehr als 48 Stunden Zeit diesen Prozeß ganz zum Stillstand bringt, wenn die Hefe abgetötet ist.

7. Versuchsreihe mit Zymin.

I. 5 g Zymin (Münchener Präparat von Anton Schroder), 10 g Quarzsand und 1 g Schwefelblume wurden unter An-

feuchten mit 20 ccm destilliertem Wasser in einem Porzellanmörser zerrieben. Nach 10—15 Minuten langem Zerreiben wurde die Masse mit 30 ccm destilliertem Wasser in ein Erlenmeyersches Kölben gespült, darauf mit 50 ccm 99%igem Alkohol (Kahlbaum) hineingegossen, das Kölbchen dann rasch mit einem Pfropfen, in dessen unteres Ende ein mit Filterpapier umwickeltes Glasstäbchen gefügt war, verschlossen. Vor Verschluss des Kölbchens war das Papier mit Bleiacetat angefeuchtet worden. Beim Durchschütteln der Flüssigkeit begann im Kölbchen sofort eine schwarze Färbung des Bleipapiers, besonders bei einem schwachen Erwärmen des Kölbchens. Nach 10 bis 15 Minuten war das Stäbchen von dem darauf entstandenen Schwefelblei vollständig schwarz geworden. Parallel dieser Probe wurde auf dieselbe Art eine Kontrollprobe mit Schwefel, doch ohne Zymin ausgeführt. Beim Schütteln und beim Stehen in gewöhnlicher Temperatur sowie beim Erwärmen im Thermostaten bei etwa 30° C. blieb das Bleipapier weiß, folglich war es das Zymin, welches die Hydrogenisation des Schwefels bewirkt hatte.

II. 5 g Zymin wurden mit 50 ccm destilliertem Wasser einige Minuten lang gekocht, darauf nach Abkühlung die Mischung mit Sand und Schwefel zerrieben und, wie schon beschrieben, mittels 50 ccm Alkohols in ein Erlenmeyersches Kölbchen gespült. Das Bleipapier zeigte nach zweistündigem Stehen des Kölbchens bei 30° C. nur eine kaum merkliche schwarzbraune Färbung. Bei einem anderen solchen Versuche, wo das Kochen des Zymins länger dauerte, blieb das Bleipapier weiß. Folglich hat gekochtes Zymin auf Schwefel keine Einwirkung, was zur Annahme zwingt, daß der Einfluß des aktiven Zymins auf Schwefel einem darin anwesenden hydrogenisierenden Enzym zuzuschreiben ist. Ohne genaue parallele Versuche anzustellen, beobachtete ich, auf Grund rein qualitativer Proben, daß zwischen der Zuckerspaltung, der Reduktion des selenigsauren Natriums und der Schwefelhydrogenisation bei Einfluß des Zymins ein Zusammenhang besteht.

Als ich selbst aus einer Preßhefensorte Zymin herstellte, hatte es fast keine Einwirkung auf Schwefel; mit Zucker und

selenigsurem Natrium angestellte Parallelproben zeigten, daß keine Entwicklung von CO_2 aus der Zuckerlösung zu bemerken war, und die sehr schwache rote Färbung der Selenflüssigkeit entstand nur nach achttägigem Stehen im Thermostaten. Das Zymin aus Bierhefe erwies sich als wirksamer, alle erwähnten Versuche mit demselben verliefen vollkommen deutlich und schnell. Die besten Resultate aber erzielte ich bei allen diesen Reaktionen mit dem Münchener Präparate.

III. Quantitative Bestimmung des durch Zymin gebildeten H_2S . Dazu benutzte ich dieselbe Methode wie bei den Versuchen mit lebender Hefe.

20 g Schrodersches Zymin wurde mit demselben Quantum Quarzsand und 1 g Schwefelblume unter Anfeuchten mit destilliertem Wasser zerrieben; die breiartige Masse mit Wasser in eine Drechselflasche versetzt. Wasser wurde im ganzen 100 ccm genommen, ebensoviel Alkohol hinzugegeben. Die gefüllte Flasche in ein Gefäß mit warmem Wasser von 45°C . gestellt. Die Entziehung des gebildeten H_2S geschah durch Kohlensäure. Der Versuch dauerte 2 Tage, wobei der Kohlensäurestrom täglich im Laufe von 4 Stunden durchgeleitet wurde. Aus dem Bromwasser wurden danach 0,01515 g BaSO_4 gewonnen, entsprechend 0,00221 g H_2S .

IV. Versuch mit Zymin ohne Zerreiben mit Sand. In zwei Erlenmeyersche Kölbchen wurden je 10 g Zymin und 1 g Schwefel abgewogen; in das eine 100 ccm wässriger Alkohol (1:1), in das andere ebensoviel destilliertes Wasser und 5 Tropfen Toluol gebracht, die Kölbchen darauf mit einem Pfropfen mit Bleipapier verschlossen und durchgeschüttelt. Die schwarze Färbung des Bleipapiers begann in der Alkoholflüssigkeit sofort und erreichte dieselbe Intensivität wie bei den Proben mit zerriebenem Zymin, bei der Probe mit Wasser aber entstand es nicht auf einmal, sondern erst nach Verlauf von 15—30 Minuten. Ein schwaches Erwärmen beschleunigte in beiden Fällen die Reaktion. Aus diesem Versuche läßt sich schließen, daß das schwefelhydrogenisierende Ferment in Wasser aufgelöst wird. Was seine Auflöslichkeit in Alkoholwasser anbetrifft, gibt außer den angeführten Beob-

achtungen auch ein unmittelbarer Versuch bejahende Antwort darauf: es wurden 100 ccm Alkoholwasser von 51,84° Stärke mit 10 g Zymin auf Temperatur von 45—50° C. im Laufe von 15 Minuten erwärmt; die Mischung darauf eine Stunde lang abgekühlt und durchgeschüttelt. Der abfiltrierte Alkoholauszug gab mit Schwefel eine deutliche Reaktion auf sich bildenden Schwefelwasserstoff.

Auf diese Weise zeigten die mit Zymin angestellten Versuche: daß sich im Zymin, folglich auch in Hefe ein Enzym befindet, welches elementaren Schwefel in Schwefelwasserstoff zu reduzieren imstande ist, daß dasselbe in Wasser und auch in Alkoholwasser (1:1) auflöslich ist, daß sich die Wirksamkeit dieses Enzyms bei Temperaturerhöhung beschleunigt (das Optimum ist nicht festgestellt), und daß es beim Kochen zerstört wird.

Was die Tatsache anbetrifft, daß Zymin, sowie durch Toluol, Thymol und Alkohol abgetötete Hefe nur geringe Mengen von H_2S bilden, so läßt sich diese Erscheinung vor allem dadurch erklären, daß das reduzierende Enzym des lebenden Hefeprotoplasmas vor dem Einfluß anderer zerstörend auf dasselbe einwirkender Fermente geschützt ist, während es in der abgetöteten Zelle ohne diesen Schutz bleibt. Möglicherweise auch hat dieses Enzym nicht vollkommen den Charakter eines Katalysators und wird bei der chemischen Arbeit verzehrt und wird nicht regeneriert, um mit neuen Mengen des zu reduzierenden Stoffes zu reagieren. In der lebenden Zelle wird ein solcher Verlust durch Neubildung des Enzyms ersetzt, deshalb bildet lebende Hefe bedeutend größere Schwefelwasserstoffmengen als abgetötete. Demgemäß ist die Hydrogenisation des Schwefels durch abgetötete Hefe analog der Zuckerspaltung durch Buchners Preßsaft, seine Präparate und das Zymin. Hier tritt auch ein kolossaler Unterschied zwischen der Wirksamkeit dieser Präparate und der Arbeit der lebenden Hefe im Gärprozesse auf.

Die mit lebender Hefe angestellten Versuche regen eine wichtige Frage an: weshalb tritt die intensivste Schwefelwasserstoffentwicklung unmittelbar nach der Gärung auf und nicht

während derselben? Wenn die Hydrogenisation des Schwefels ein enzymatischer Prozeß ist, so sollte man annehmen, daß die Hefe im Moment der lebhaftesten Gärtätigkeit die größte Menge des hydrogenisierenden Ferments enthält. Doch darf man sich nicht vorstellen, daß dieses Ferment speziell zur Hydrogenisation des Schwefels hervorgerufen werde, denn derselbe ist in der Gärflüssigkeit zufällig anwesend und zur Erregung der Alkoholgärung nicht nötig. Zweifellos nimmt der Schwefel in diesem Falle an dem rein chemischen Prozesse der gegenseitigen Wirkung mit freien Wasserstoffionen teil, welche, wohl aus dem Wasser, durch das reduzierende Ferment der Hefe in Freiheit gesetzt worden sind, und deren Einwirkung viele Stoffe unterzogen werden können. Der Schwefel ist eben ein solcher Stoff. Wenn das der Fall ist, so ist der Grund im Gärprozesse selbst zu suchen. Augenscheinlich ist das reduzierende Ferment, dessen Anwesenheit festgestellt zu sein scheint, bei der chemischen Arbeit im Gärprozesse erforderlich. W. Palladin vermutet, daß es an der Spaltung des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure unmittelbar teilnimmt. Die Zukunft wird zeigen, inwieweit diese Annahme berechtigt ist. Vielleicht ist seine Rolle bescheidener und beschränkt sich nur auf einen Teil der Arbeit, jedenfalls aber spielt Reduktase im Gesamtprozesse der Zuckerspaltung eine verantwortliche Rolle, und so lange diese Arbeit vor sich geht, ist es, den Versuchen Palladins nach, nicht frei und reduziert deshalb das selenigsaure Natrium nicht. Letztere Beobachtung des Verfassers stimmt mit meinen Versuchsergebnissen vollkommen überein. Die Maximalquantität des Schwefelwasserstoffs bildet sich nur dann, wenn die Hauptmenge des Zuckers zersetzt und die Gärung zu Ende ist. Als selbstverständlich ist es anzunehmen, daß gleich nach Abschluß der Gärung die Hefezellen noch alle Gärfermente aufweisen. Die in diesem Momente reichliche Entwicklung von H_2S zeigt, daß unter denselben das reduzierende Ferment anwesend ist. Mit Abschluß der Gärung aber schwindet das Bedürfnis an Zuckerspaltungsfermenten, die Hefezellen stellen die Produktion derselben ein, und zusehends rasch vermindert

sich auch Schwefelwasserstoffbildung in den darauffolgenden Perioden.

Demnach erklärt sich die Hydrogenisation des Schwefels bei Alkoholgärung durch Entstehung reduzierender, an der Zuckerspaltung teilnehmender Fermente in den Hefezellen, und darum muß die Alkoholgärung in einer ihrer Phasen ein Reduktionsprozeß sein.

M. Chowrenko.

