

Über Beeinflussung der alkoholischen Gärung in der Zelle und im Zellpreßsaft.

Von
Alfred Dorner.

(Aus der medizinischen Klinik in Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 21. August 1912.)

Antiseptika wie Toluol hemmen die Gärung in lebenden Hefezellen fast völlig, nicht aber die Gärung im Hefepreßsaft.¹⁾ In diesem Zusammenhang bezeichnet man Toluol als ein Protoplasmagift und unterscheidet zwischen Protoplasmagiften und Fermentgiften;²⁾ womit die interessante Tatsache nur umschrieben, nicht erklärt ist.³⁾

Ich habe, auf Anregung und unter Leitung von Dr. Warburg, die Beeinflussung der Gärung in der lebenden Zelle und im Preßsaft für eine größere Anzahl Substanzen verglichen und gefunden, daß im allgemeinen eine Substanz, die die Zellgärung hemmt, auch die Preßsaftgärung hemmt, mit dem Unterschied, daß zur Erreichung desselben Erfolgs für die lebende Zelle eine geringere Konzentration ausreicht, als für den Preßsaft. Daraus ergibt sich zunächst, daß Substanzen, von denen erst eine gesättigte

¹⁾ E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, «Die Zymasegärung» (1903.) — Wahrscheinlich gehört hierher auch die von E. Fischer und Lindner schon 1895 (Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft Bd. 28, S. 3034) angeführte Beobachtung, daß Toluol die Zuckerinversion durch frische *Monilia* hemmt, durch getrocknete (abgetötete) nicht hemmt.

²⁾ Hans Euler und Sixten Kullberg, «Über das Verhalten freier und an Protoplasma gebundener Hefeenzyme». Diese Zeitschr., Bd. 73, S. 85.

³⁾ Buchner (Zymasegärung, Seite 180) glaubt, daß Toluol nicht direkt auf die Gärung wirkt, sondern nur die Fermentproduktion verhindert. In jedem Augenblick soll nur eine kleine Menge Ferment in der lebenden Zelle vorrätig sein. Wäre diese Auffassung richtig, so dürfte die Gärungsgröße der lebenden Zelle durch Toluol nicht stärker erniedrigt werden als durch Abtötung mit Aceton. In Wirklichkeit aber ist die Toluolhemmung sehr erheblich stärker.

Lösung die Zellgärung hemmt, auf die Preßsaftgärung ohne Einfluß sein werden; in der Tat wirken die Alkohole der Fettreihe,¹⁾ vom Methylalkohol bis zum Amylalkohol, sowohl auf Zellgärung als auch auf Preßsaftgärung; der Heptylalkohol jedoch, von dem erst eine gesättigte Lösung die Zellgärung völlig hemmt, wirkt kaum mehr²⁾ auf die Preßsaftgärung. Analog sind die Verhältnisse in der Urethanreihe; vom Methylurethan bis zum Butylurethan aufwärts werden beide Gärungen gehemmt; Phenylurethan jedoch, dessen gesättigte Lösung erst die Zellgärung stark hemmt, ist fast ohne Einwirkung auf die Preßsaftgärung.³⁾ (Beispiele in Tabelle I.)

Tabelle I (Temperatur ca. 24°).

Substanz	Gewichtsprozent	Gärungshemmung im Preßsaft ca. Versuchsdauer 30 Minuten	Gärungshemmung in der lebenden Zelle ca.
Methylurethan	10	72%	fast 100%
	5	19%	75%
Äthylurethan	8	70%	fast 100%
	5	40%	—
	3	17%	41%
Propylurethan	6	95%	—
	3	62%	84%
Butylurethan (iso)	1	24%	78%
Phenylurethan	gesättigt	fast keine Hemmung	60%
Amylalkohol (Gärungs-)	2	46%	fast 100%
	1	fast keine Hemmung	70%
Heptylalkohol (Merck)	gesättigt	12%	fast 100%
	¹ / ₂ gesättigt	fast keine Hemmung	50%

Es bleibt die Frage, warum im Preßsaft eine höhere Konzentration notwendig ist als in der Zelle. Nun verstehen wir

¹⁾ O. Warburg und Wiesel, «Über die Wirkung von Substanzen homologer Reihen auf Lebensvorgänge». Pflügers Archiv, B. 144, S. 465.

²⁾ Vgl. bezügl. «Wirkungslosigkeit» das, was im experimentellen Teil über den Zeitfaktor gesagt ist.

unter hemmender Konzentration für lebende Zellen diejenige der umspülenden Flüssigkeit; es ist aber gezeigt worden,¹⁾ daß Substanzen, wie sie hier in Betracht kommen — Thymol, Phenylurethan usw. — in lebenden Zellen sehr stark angehäuft werden, sodaß mit der Konzentration eines Stoffes in der umspülenden Flüssigkeit die Konzentration an den Stellen der Zelle, an denen die Fermentreaktion vor sich geht, keineswegs identisch zu sein braucht. Die Vermutung, daß hier die Erklärung für die stärkere Wirkung innerhalb der Zelle liegt, ist äußerst plausibel.²⁾

Die Anreicherung in der Zelle ist für die schwerlöslichen, höhermolekularen Substanzen am größten, sodaß für diese auch die Unterschiede in der Wirkungsstärke innerhalb und außerhalb am größten sein müßten. Doch wollen wir davon absehen, die Theorie weiter auszuspinnen, weil der physikochemische Mechanismus der Anreicherung — ob Verteilung, ob Verdichtung an Oberflächen — noch nicht genügend aufgeklärt ist. Jedenfalls findet die Anreicherung von Thymol nicht gleichmäßig an allen Zellbestandteilen statt, sondern, wie Herr Usui³⁾ in letzter Zeit festgestellt hat, zu einem großen Teil an den vom flüssigen Protoplasma befreiten Strukturteilen. —

Nur in losem Zusammenhang mit dem Thema steht ein weiteres Resultat, das eine gewisse Beachtung verdient. Vergleicht man die Konzentrationen, die die Gärung in lebenden Hefezellen hemmen, mit denen, die die Atmung in lebenden Zellen hemmen, so besteht ein ganz auffallender Parallelismus, der zu der Annahme fast zwingt, daß die Ursache dieser Wirkungen in beiden Fällen die gleiche ist.⁴⁾ Zum Beleg dient die folgende Tabelle.

¹⁾ Warburg und Wiesel, loc. cit.

²⁾ Diese Auffassung führt zu der wichtigen Konsequenz, daß die Zymase in der lebenden Zelle sich nicht im flüssigen Zellinhalt befindet, sondern daß die Verhältnisse in der lebenden Zelle ähnlich wie für das Atmungsferment liegen.

³⁾ Noch nicht publiziert.

⁴⁾ Vermutlich wäre die Übereinstimmung eine vollkommene, wenn auch die Atmungshemmungen an der Hefezelle festgestellt wären.

Tabelle II.

Substanz	Gärungshemmung ¹⁾ von etwa 50 % in lebenden Hefezellen durch Gewichtsprocente	Atmungshemmung von etwa 30—70 % in lebenden Zellen durch Gewichtsprocente
Äthylurethan	3,6	3,5 ²⁾
Propylurethan	2,0	1,0 ²⁾
Butylurethan (iso)	0,7	0,5 ²⁾
Phenylurethan	0,1	0,05 ²⁾
Dimethylharnstoff	9,0	8,0 ²⁾
Diäthylharnstoff	5,0	2,0 ²⁾
Phenylharnstoff	0,5	0,25 ²⁾
Propionitril	4,0	2,0 ³⁾
Valeronitril	0,7	0,5 ³⁾
Methylpropylketon	2,0	1,5 ³⁾
Methylphenylketon	0,17	0,17 ³⁾
Amylalkohol (Gärungs-)	0,7	0,5 ⁴⁾

Versuchsordnung.

Zu allen Versuchen, auch zur Bereitung der Preßsäfte, wurde obergärrige käufliche Preßhefe benutzt, deren Verunreinigungen nicht störten. Die entwickelte Kohlensäure wurde durch die Druckzunahme gemessen, die eine bestimmte Menge Hefesuspension oder Preßsaft in einem geschlossenen Raum hervorbrachte. Als Manometer verwendet man zweckmäßig die von Haldane und Barcroft⁵⁾ für die Blutgasanalysen eingeführten. Die Manometerflüssigkeit war die von Brodie empfohlene Gallensäurelösung,⁶⁾ (10 000 Millimeter = einer Atmosphäre). Wie bei den Blutgasanalysen üblich, wurden

¹⁾ Siehe experimenteller Teil, Tabelle III.

²⁾ Für *Vibrio Metschnikoff*: Warburg und Wiesel, *Pflügers Archiv*, Bd. 144, S. 465.

³⁾ Für rote Vogelblutzellen: O. Warburg, *Verhandlungen des deutschen Kongresses für innere Medizin*, 1911, S. 553.

⁴⁾ Für rote Vogelblutzellen: O. Warburg, *Diese Zeitschrift*, Bd. 76, S. 331.

⁵⁾ Barcroft, *Ergebnisse der Physiologie*, 1908.

⁶⁾ *Diese Zeitschrift*, Bd. 76, S. 331.

die Manometer mit den Schüttelflaschen verbunden, in einen Thermostaten von etwa 24° gehängt; nach Temperaturlausgleich und Schluß der Hähne wurde geschüttelt, die dabei auftretende Druckzunahme durch Öffnen der Hähne wieder ausgeglichen und Schütteln und Öffnen mehrmals wiederholt, bis die Druckzunahme beim Schütteln nicht mehr als 1 oder 2 mm betrug. Die Apparate blieben nun eine passende Zeit, gewöhnlich 30 bis 60 Minuten, ruhig im Thermostaten hängen und wurden dann wiederum bis zur Druckkonstanz geschüttelt. In unsern Versuchen waren die Volumina, in denen die Drucke entstanden, annähernd gleich, nämlich 38 cm, sodaß, wenn in jeder Flasche gleiche Hefemengen waren, die Druckzunahmen¹⁾ direkt im Verhältnis der Gärungsgrößen standen. Die Druckzunahmen sind im folgenden als p bezeichnet, und, da es nur auf Vergleichswerte ankam, die CO_2 -Mengen nicht ausgerechnet. Dies würde geschehen nach der Formel

$$v_0 = \frac{p \cdot v}{p_0 (1 + \alpha t)}$$

wobei p die Druckzunahme, $p_0 = 10000$; $v = 38$; $t = 24$. v_0 ist dann ccm CO_2 (0°, 760 mm). Um einen Anhaltspunkt für die absoluten Größen zu geben, sei erwähnt, daß bei einem p von 100 die entwickelte CO_2 etwa gleich 0,37 ccm (0°, 760 mm).²⁾

Die (sehr empfehlenswerte) Versuchsanordnung wurde gewählt, weil man nur bei kurzen Versuchszeiten einfache Resultate erhält (Fehler etwa 5% vom Wert). Bei längeren Zeiten nämlich kann, wenn man mit lebenden Zellen arbeitet, Vermehrungshemmung eine Gärungshemmung vortäuschen. Aus Nr. 1 ergibt sich, daß bei unserer Anordnung Vermehrung der Hefezellen nicht in Betracht kam. Bei Preßsaftversuchen sind lange Zeiten deshalb ganz unbrauchbar, weil die Hemmungen «progressiv» sind,³⁾ d. h. die Wirkung einer Substanz nimmt mit der Zeit zu, ebenso wie die Nieder-

¹⁾ Luftdruckänderungen und Temperaturänderungen gibt ein gleichzeitig eingehängtes Thermobarometer an. Die Druckänderungen des Thermobarometers werden von den p -Werten abgezogen bzw. zu ihnen addiert.

²⁾ Eine Korrektur für die gelöste Kohlensäure wird angebracht.

³⁾ Vgl. Versuch Nr. 3 und Warburg u. Wiesel, loc. cit.

schlagsbildung,¹⁾ deren Parallelismus mit der Gärungshemmung wieder ganz eklatant war.

Wenn in aufeinander folgenden Perioden von 30 Minuten die Hemmungen im Preßsaft zunehmen, so könnte man sich fragen, ob es richtig ist, für Vergleiche mit lebenden Zellen die ersten Perioden heranzuziehen. Wir glauben das durchaus und können die Resultate genauer vielleicht so ausdrücken, daß bei der Konzentration c einer Substanz im Preßsaft noch Zucker vergoren werden kann, bei der in der lebenden Zelle die Gärung schon völlig gehemmt ist. Damit ist dann nicht gesagt, daß unter allen Umständen bei der Konzentration c im Preßsaft Zucker vergoren wird.

Eine besondere Beachtung verdient die Frage, wie gut die Konzentrationen definiert sind. Für die lebenden Zellen liegen die Verhältnisse sehr einfach, man wäscht sie bis zum Gleichgewicht mit Lösungen bekannter Konzentration. (Die Schüttelflaschen hatten solche Maße, daß sie in eine kleine Runnesche Zentrifuge paßten. Die Zellen wurden also in demselben Gefäß gewaschen, in dem ihre Gärungsgröße gemessen wurde. 2 ccm einer Hefesuspension, in der 1 g Preßhefe auf 40 ccm verteilt war, wurden in jedes Gläschen gebracht, dann mit einer Zuckersalzlösung (5 g Traubenzucker, 2 g K_2HPO_4 , 100 ccm Wasser) eventuell unter Zusatz hemmender Substanzen auf ein passendes Volumen aufgefüllt, zentrifugiert, wieder aufgefüllt usw. In der Regel wurden 4 Röhrchen angesetzt, nämlich eines mit der Zuckersalzlösung allein («Kontrolle») und drei mit fallenden Konzentrationen der hemmenden Substanz. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde bis auf 2 ccm wieder abgehebert.²⁾)

Für den Preßsaft dagegen liegen die Verhältnisse komplizierter. Lösen wir z. B. in 100 ccm Preßsaft 0,02 g Phenylurethan oder Thymol, so ist die Konzentration

¹⁾ Vgl. Warburg und Wiesel, loc. cit.

²⁾ Die Atmung der Hefezellen kommt als Fehlerquelle kaum in Betracht. Einerseits ist der Sauerstoffverbrauch nur ein kleiner Bruchteil der CO_2 -Bildung, andererseits der respirator. Quotient nicht kleiner als 0,7. Schließlich sind die Zellen bei den Versuchsbedingungen die längste Zeit unter O_2 -Mangel.

nicht 0,02%, sondern bedeutend kleiner.¹⁾ Die betreffenden Substanzen nämlich werden im Preßsaft physikalisch oder chemisch teilweise gebunden, und die Nichtbeachtung dieser Tatsache kann zu groben Irrtümern führen. Will man sicher sein, eine gesättigte Phenylurethanlösung in der wässrigen Phase des Preßsaftes zu haben, so muß man soviel Substanz zugeben, daß überschüssiges ungelöstes Phenylurethan in dem Saft suspendiert ist, und erst wenn derartige Flüssigkeiten noch Zucker vergären, lebende Zellen aber in gesättigter Suspensionsflüssigkeit nicht, so ist ein Unterschied zwischen Zellgärung und Saftgärung festgestellt. Für Substanzen abwärts vom Butylurethan und Amylalkohol in den homologen Reihen ist diese Vorsicht nach unseren bisherigen Erfahrungen überflüssig; die Anreicherung kommt hier nicht mehr soweit in Betracht, daß sie die Konzentrationen erheblich vermindert.

Die Preßsäfte wurden nach der Buchnerschen Vorschrift mit Sand, Kieselgur und einer hydraulischen Presse hergestellt. 2 Teile Preßsaft wurden mit einem Teil einer 6%igen Traubenzuckerlösung vermischt; von dieser Flüssigkeit kamen für jede Bestimmung 2 ccm zur Verwendung. Im allgemeinen wurden 4 Proben angesetzt, eine als «Kontrolle» ohne Zusatz, die 3 anderen mit fallenden Mengen hemmender Substanzen.

1. Amylalkohol (Gärungs-) und lebende Hefezellen. 3 Perioden von 30 Minuten.

	I. Periode	II. Periode	III. Periode
Kontrolle	p = 185	p = 217	p = 208
2%	p = 0	p = 0	p = 0
1%	p = 45	p = 64	p = 64

¹⁾ Werden die Stoffe nicht chemisch, sondern physikalisch gebunden, z. B. an die Kolloidteilchen adsorbiert, so wird allerdings die Menge pro Volumeinheit in jedem analysierbaren Teil der Lösung nicht vermindert. Wohl aber wird der Dampfdruck, der osmotische Druck usw. der betreffenden Substanz vermindert, sodaß der Ausdruck «Konzentrationsverminderung» korrekt ist.

1 a. Amylalkohol und Preßsaft. 30 Minuten bei 24°.

Kontrolle: $p = 244$ 2% Amylalkohol: $p = 132$.

2. Heptylalkohol (Merck) und lebende Zellen. 30 Minuten.

a) Gesättigte Lösung: $p = 0$ b) $1/2$ gesättigte Lösung: $p = 105$ c) Kontrolle: $p = 224$.

2a. Heptylalkohol und Preßsaft. 30 Minuten.

a) Kontrolle: $p = 177$ b) Preßsaft + überschüssiger Heptylalkohol: $p = 156$.

3. Zunahme der Hemmung im Preßsaft mit der Zeit.

8% Äthylurethan in 30 Minuten bei 24°: $p = 57$ Kontrolle: $p = 150$.

Nun kamen beide Proben $1\frac{1}{2}$ Stunden in den Thermostaten bei 29°. Darauf wurde die Gärungsgröße bei 24° in 30 Minuten wieder bestimmt.

8% Äthylurethan: $p = 7$ Kontrolle: $p = 103$.

4. Äthylurethan und Preßsaft. a), b) und c) verschiedene Versuche.

a) 30 Minuten: Kontrolle: $p = 123$; 6% $p = 44$.b) 30 " : " : $p = 99$; 8% $p = 31$.c) 30 " : " : $p = 220$; 3% $p = 183$;5% $p = 132$.

5. Methylurethan und Preßsaft. 30 Minuten.

a) Durch 10% p von 220 auf 59; durch 5% p von 220 auf 178.b) Durch 5% p von 92 auf 75.

7. Propylurethan und Preßsaft. 30 Minuten.

 p durch 6% von 123 auf 6; durch 3% von 123 auf 47.

8. Butylurethan und Preßsaft. 30 Minuten.

 p durch 1% von 99 auf 75.

9. Phenylurethan und Preßsaft. 30 Minuten.

I. In 10 ccm Preßsaft 0,2 ccm 50% Phenylurethan (alkoholische Lösung). Dann viele ungelöste Partikel.

II. In 10 ccm Preßsaft 0,2 ccm Alkohol.

III. Kontrolle.

p durch I von 213 auf 191; durch II von 213 auf 185, so daß also Hemmung jedenfalls sehr gering und zum Teil oder völlig von den 2% Alkohol. (In II etwas mehr Alkohol wie in I, Hemmung auch etwas stärker.)

Tabelle III: Gärungshemmung in lebenden Zellen.
(t = ca. 24°, Versuchszeit 30 bis 60 Min.).

Substanz	Mengen in Gewichtsprozenten	p-Werte
Äthylurethan	Kontrolle	232
	6%	33
	3%	136
Propylurethan	Kontrolle	249
	3%	40
	1,5%	155
Butylurethan (iso)	Kontrolle	212
	1%	47
	0,5%	174
Phenylurethan	Kontrolle	276
	0,14%	113
	0,07%	171
Dimethylharnstoff	Kontrolle	234
	12%	48
	6%	164
Diäthylharnstoff	Kontrolle	203
	5%	73
Phenylharnstoff	Kontrolle	228
	0,5%	102
Propionitril	Kontrolle	212
	4%	100
Valeronitril	Kontrolle	285
	1%	84

Tabelle III. (Fortsetzung.)

Substanz	Mengen in Gewichtsprozenten	p-Werte
Methylpropylketon	Kontrolle	245
	2%	105
Methylphenylketon	Kontrolle	277
	0,25%	73
	0,14%	190
Amylalkohol (Gärungs-)	Kontrolle	185
	1%	43
	0,5%	156