

# Enzymatische Studien über Zuckerspaltungen.

Von

H. Euler und O. Svanberg.

Mit 3 Figuren im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.  
(Der Redaktion zugegangen am 8. April 1919.)

## Inhaltsübersicht:

A. Einleitung. — B. Methoden und Versuchsbedingungen. — C. Verlauf der Zuckerspaltung durch lebende Hefe bei  $pH = 8$ : 1. Gärung der Glukose: a) Hefe SB, b) *Torula Hansen* (Svanberg); 2. Gärung anderer Hexosen; 3. Hydrolyse und Gärung von Biosen; 4. Giftwirkungen auf lebende Hefe in alkalischer Lösung. — D. Verlauf der Zuckerspaltung durch Trockenhefe bei  $pH = 8$ . — E. Zuwachs von Hefen in alkalischer Lösung: 1. Froberg-Unterhefe, Wachstumsgrenzen, Aciditäts-Empfindlichkeitskurve des Wachstums; 2. Oberhefe SB; 3. *Saccharomyces ellipsoideus*; 4. *Pseudosaccharomyces apiculatus*; Anhang: *Aspergillus*. — F. Zusammenfassung.

## A. Einleitung.

Unter den zahlreichen Bedingungen, welche den Zuckerabbau im Tierkörper beeinflussen, verdient zweifellos die Acidität des Blutes und der am Zuckerabbau beteiligten Organe die größte Aufmerksamkeit, und es erheischen die Änderungen der Acidität, welche gleichzeitig mit den Störungen dieses Prozesses bei Diabetikern eintreten, ein systematisches Studium. Die Untersuchungen über alkalische Phosphatgärung, welche der eine von uns vor etwa 3 Jahren mit Th. Tholin ausführte<sup>1</sup>, hatte einerseits das Ziel, einen genaueren Einblick in die Teilreaktionen der Hefegärung zu gewinnen, da anzunehmen war, daß die Komponenten des

<sup>1</sup>) Euler und Tholin, Diese Zeitschr. Bd. 97, S. 269 (1910).

Zymasekomplexes in alkalischer Lösung in anderem Verhältnis zur Wirkung gelangen, als in saurem Medium, andererseits war die bis dahin unbekannte alkalische Phosphatgärung insofern von großem Interesse, als besonders durch die bemerkenswerten Arbeiten von Rona und seinen Mitarbeitern<sup>1</sup>, namentlich Wilenko, bekannt geworden ist, daß Phosphat in alkalischer Lösung bei der Glykolyse eine wesentliche Wirkung ausübt, deren Vergleich mit dem entsprechenden Vorgang bei der Hefegärung neue Gesichtspunkte zu liefern versprach. Durch die Versuche von Euler und Hammarsten<sup>2</sup>) war das früher gewonnene Resultat bestätigt worden, daß Phosphat den zeitlichen Verlauf der alkalischen Gärung durch lebende Hefe nicht erhöht, sondern vielmehr verzögert.

Die weitere Verfolgung dieser Arbeiten führte zunächst zu einer quantitativen Untersuchung der Gärprodukte sowie der Grenzen der Alkalinität, welche verschiedene Hefen tragen können. Es ergaben sich bedeutende Verschiedenheiten sowohl in der Toleranz der Hefen gegen Alkali, als in der quantitativen Zusammensetzung ihrer Gärprodukte. So zeigte es sich bei noch unveröffentlichten Versuchen mit verschiedenen Hefen, daß die Entwicklung von Alkohol und Kohlensäure in verschiedenem Grad zurückgedrängt werden kann, während gleichzeitig wechselnde Mengen anderer Stoffe auftreten.

Es ist zu erwarten, daß die vielfachen Beziehungen, welche zwischen der enzymatischen Zuckerspaltung im Tierkörper einerseits und in der Hefe andererseits bestehen, deutlicher hervortreten, wenn beide Vorgänge bei übereinstimmenden oder ähnlichen Aciditäten untersucht werden. Wir haben uns auch aus diesem Grund im allgemeinen an die schwachen Alkalinitäten bis etwa  $p_{H} = 8$  gehalten; die Al-

<sup>1</sup>) Rona und Arnheim, Biochem. Zeitschr. Bd. 48, S. 35 (1913). — Rona und Wilenko, Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 173 (1914) und Bd. 62, S. 1 (1914).

<sup>2</sup>) Euler und Hammarsten, Biochem. Zeitschr. Bd. 76, S. 311 (1916).

kalinität des normalen Blutes beträgt nach den genauen Messungen von Hasselbalch<sup>1)</sup>  $p_H = 7,3$  bis  $7,5$ .

Einige Zeit nach den Untersuchungen von Euler, Tholin und Hammarsten erschien eine Arbeit von Neuberger und Färber<sup>2)</sup>, welche ebenfalls die alkalische Gärung behandelt und einige recht bemerkenswerte Angaben enthält; dieselbe nimmt indessen keinen Bezug auf unsere Untersuchungen und scheint andere Ziele als unsere Untersuchungen zu verfolgen.

An unsere ersterwähnten Arbeiten hat Wilenko<sup>3)</sup> eine Mitteilung geknüpft über das Ausbleiben der Bildung von  $CO_2$  bei alkalischer Gärung unter gewissen Bedingungen. Wir werden auf seine Angaben später zurückkommen, können aber hier schon betonen, daß, abgesehen von Befunden an einigen Unterhefen, nach denen gelegentlich die Kohlensäurebildung geringer war als die Alkoholbildung — nach unseren bisherigen Erfahrungen in der weitaus überwiegenden Mehrzahl der Fälle auch in alkalischer Lösung äquivalente Mengen von Alkohol und Kohlensäure entstehen.

### B. Methoden und Versuchsbedingungen.

Nachdem wir uns beim Beginn des Herbstsemesters 1917 durch zahlreiche Gärversuche davon überzeugt hatten, daß unsere Unterhefe H für unsere Versuche über alkalische Gärung ganz ungeeignet war (in etwa 50% der Versuche trat keine Gärung ein und oft hörte die Gärung ohne erkennbare Ursache auf), wandten wir zu den im folgenden mitzuteilenden Versuchen eine Brennerei-Oberhefe an, die wir in unserem Laboratoriumstagebuch als Oberhefe S B (I und II) bezeichnet haben. Dieselbe hat sich zu unseren Versuchen insofern recht geeignet erwiesen, als die Gärkraft auch in alkalischen Lösungen sehr konstant ausfiel.

<sup>1)</sup> Hasselbalch, Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 317 (1911). — Hasselbalch und Lundsgaard, ebenda Bd. 38, S. 77 (1912).

<sup>2)</sup> Neuberger und Färber. Biochem. Zeitschr. Bd. 78, S. 238 (1917).

<sup>3)</sup> Wilenko. Diese Zeitschr. Bd. 98, S. 255 (1917).

Diese Hefe läßt sich folgendermaßen charakterisieren:

### Gärkraft.

Bei optimaler Acidität,  $p_{H} = 5$ , werden 2 g Hefe vom Trockengewicht 30,5% in 150 ccm einer Lösung aufgeschlemmt, welche 2% Natriumphosphat und 4% Rohrzucker, bei Versuchen mit Stickstoffnahrung 50 ccm Hefenwasser<sup>1)</sup> (enthaltend 0,3% N), also rund 0,75% Eiweißabbauprodukte enthielt.

Es wurden folgende Zahlen erhalten<sup>2)</sup>:

Stunden	Mit Hefenwasser		Ohne Hefenwasser	
	ccm CO <sub>2</sub>	Zellenzahl	ccm CO <sub>2</sub>	Zellenzahl
0	—	176	—	180
1	130	207	55	183
2	379	237	120	186
3	721	280	205	191
4	1170	326	281	196

Zur Beurteilung der bei der Vergärung verschiedener Zuckerarten erhaltenen Zahlen war es erforderlich, die Größe der Selbstgärung unserer Hefe bei entsprechender Alkalinität kennen zu lernen. Versuche von Frl. Hallberg ergaben folgendes Resultat:

Hefe ohne Zuckerzusatz.  $p_{H} = 8$ .

50 ccm Na-Phosphat, 15% ig.

30 „ Hefenwasser (ca. 2% Peptone etc.).

70 „ Wasser,

0,5 „ Phenolphthaleinlösung,

10 g Hefe (30% Trockengewicht),

Gärungsstunden:	0	1	2	3	4
ccm 2-n. NaOH:	0,5	0,5	0,5	0	0

In 4 Stunden entwickelt:

CO <sub>2</sub>	0,10 g
Alkohol	0,11 g

<sup>1)</sup> 40 g Hefe mit 1 l Wasser 1 Stunde gekocht und nach Abkühlen filtriert.

<sup>2)</sup> Siehe im übrigen die mit der gleichen Hefe SB II erhaltenen Ergebnisse in der Arbeit von Euler und Heintze. Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 7 (1919).

Mit diesen Werten für die Selbstgärung der angewandten Hefe sind die in den folgenden Versuchen gewonnenen Zahlen korrigiert.

Die Zellenzahl pro g Trockengewicht der Hefe beträgt:

$$0,30 \cdot 10^{11}$$

Dieselbe hat sich über ein Jahr lang als sehr konstant erwiesen. Die Zellenzahl per g Trockengewicht ist demnach fast doppelt so groß als diejenige unserer Brauerei-Unterhefe H.

Der mittlere Durchmesser der Zellen ist 6  $\mu$ .

Der Invertasegehalt ist gegeben durch den Quotienten:

$$\frac{\text{Inversionskonstante} \times \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}} = 4 \pm 1 \cdot 10^{-12}$$

Zur Verfolgung des Gärungsverlaufs wurden folgende Methoden angewandt:

1. Volumetrische oder gewichtsanalytische Bestimmung des entwickelten Kohlendioxyds;
2. Bestimmung des gebildeten Alkohols aus dem spezifischen Gewicht der Destillate;
3. Titration der Lösung mittels Natronlauge und Phenolphthalein als Indikator;
4. Reduktion und Messung der optischen Drehung.

1. Die quantitative Bestimmung der in den alkalischen ausgegorenen Flüssigkeiten gebundenen Kohlensäure geschah im allgemeinen durch vorsichtiges Austreiben mit Phosphorsäure oder Schwefelsäure und Auffangen des Gases in Quecksilberbüretten bei Zimmertemperatur. Zu diesem Zweck wurden von der betreffenden, von Hefe abfiltrierten Flüssigkeit 25—50 ccm in einen 250 ccm-Gärkolben einpipettiert, der teils mit der Kapillarröhre der Quecksilberbürette, teils mit einer kleinen gradierten Bürette verbunden war, durch welche die Mineralsäure durch Unterdruck eingesogen wurde.

Diese Methode wurde durch gewisse analytische Bestimmungen der Kohlensäure — Austreiben von CO<sub>2</sub> mittels 50%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Verdrängen des Gases durch kohlensäurefreie Luft und Wägen im Liebig'schen Apparate — ver-

glichen, wobei immer übereinstimmende Zahlen gefunden wurden.

2. Die Bestimmung des Alkohols wurde immer durch Abdestillieren über H e m p e l s Rückflußkühler aus 50 ccm filtrierter alkalischer Flüssigkeit + 50 ccm Wasser und Auffangen und Wägen des Destillates in einem 25 ccm fassenden geaichteten Pyknometer ausgeführt.

Die im folgenden angegebenen Zahlen sind immer Mittelwerte aus 2 meistens sehr gut miteinander übereinstimmenden Versuchen.

3. Bei der fortschreitenden Vergärung wurde die angegebene Alkalinität des Mediums durch stetige Zusätze von Alkali aufrecht erhalten unter s t ä n d i g e r Kontrolle der Reaktion, teils mit Indikatoren (Lakmus und Phenolphthalein), teils elektrometrisch nach der Gasketten-Methode.

4. Das Verschwinden des Zuckers wurde durch die Methode von B e r t r a n d messend verfolgt. Wegen der Ausführungsform verweisen wir auf die Originalarbeit und auf die Beschreibung in A b d e r h a l d e n s Handbuch, Teil II. Die optische Methode zur Zuckerbestimmung ist hier viel weniger geeignet, teils wegen der Anwesenheit anderer drehender Stoffe (Bestandteile des Hefenwassers), teils weil die Reduktionsmethode eine viel geringere Substanzmenge zur genauen Analyse erfordert. Bei den Inversionsversuchen (Kap. 3) wurde der Reaktionsverlauf durch Polarisation der mit 50 % 1-normaler Sodalösung (zum Aufheben der Multirotation der Glukose) versetzten Lösung verfolgt. Bei der Inversion in stärker alkalischer Lösung ( $p_H = 8,5$ ), wo Phenolphthalein der Lösung zugesetzt war, wurde jedoch die Reduktionsmethode verwendet.

Bei unseren ersten Versuchen wurde die Hefe durch  $\frac{1}{2}$ —1 stündiges Gären bei saurer Reaktion vorbehandelt, ehe die alkalische Gärung ausgeführt wurde. Diese Maßnahme erwies sich später als unnötig, da die Oberhefe S B ohnehin in alkalischer Lösung stets eine regelmäßige Angärung zeigte. Die bei diesen „Vorgärungen“ entwickelten Mengen  $CO_2$  wurden an Parallelproben in angeschlossenen Queck-

silberbüretten gemessen. Bei den alkalischen Gärungen entwickelten keine  $\text{CO}_2$ -Mengen aus dem Gärgefäß. Vielmehr wurde die während der Vorgärung gebildete  $\text{CO}_2$  zum Teil in die Lösung zurückgesogen. Dadurch vereinfachte sich die apparative Anordnung wesentlich, indem also die alkalische Gärung direkt in offenen Gefäßen ausgeführt werden konnte.

Die Versuchskolben befanden sich während der Gärung in Wasserthermostaten und wurden darin bei der angegebenen Temperatur, wenn nicht anders angegeben,  $28^\circ$ , innerhalb  $0,5^\circ$  konstant gehalten.

Unter der Bezeichnung „andere Gärprodukte“ fassen wir die Substanzen zusammen, welche in folgender Weise aus den gegorenen Flüssigkeiten erhalten wurden:

Nach Austreiben der Kohlensäure unter Rückfluß wurden die flüchtigen Säuren abdestilliert (sie betragen stets etwa 2—3% des vergorenen Zuckers und bestanden fast quantitativ aus Essigsäure, neben welcher Ameisensäure höchstens in Spuren auftrat). Von der übrigbleibenden Flüssigkeit wurden 1000 ccm mit konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und auf dem Wasserbad auf 200 ccm eingedampft. 500 ccm 96%iger Alkohol wurde nun zugesetzt, worauf die Phosphate auskristallisieren und abfiltriert werden. Die Lösung wird auf dem Wasserbad zur Trockenheit eingedunstet, der Rest 2 Stunden unter dem Rückflußkühler auf dem Wasserbad mit 200 ccm absoluten Alkohols extrahiert, wobei 7 ccm Äther zugesetzt werden, um die Löslichkeit der Salze und des unvergorenen Zuckers herabzusetzen. Die alkoholische Lösung wird vom ungelösten Rest abfiltriert und auf Zucker geprüft. Der Rückstand wird in 500 ccm Wasser gelöst, wovon Doppelproben von 5 ccm zur Prüfung auf anwesenden Zucker verwendet wurden. Die alkoholischen Lösungen werden bis zur dicken Sirupkonsistenz eingedunstet und bis zur Gewichtskonstanz gewogen. Der Sirup enthielt 2,4% Asche und bestand im wesentlichen aus Glyzerin<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Siehe hierzu Neuberg und Färber, Biochem. Zeitschr. Bd. 78, S. 238 (1917).

### C. Verlauf der Zuckerspaltung durch lebende Hefe bei $p_{\text{H}} = 8$ .

#### 1. Gärung der Glukose.

##### Versuch 1.

400 ccm 15%ige Na-Phosphatlösung  $p_{\text{H}} = 7,4$

50 ccm Wasser

50 ccm Hefenwasser (20 g Trockenhefe mit 500 ccm Wasser 1 Stunde digeriert)

1 100 ccm Glukoselösung (21,8%ig)

600 ccm

45 g Brennerei-(Preß-)Hefe. Versuchstemperatur 28,5°.

1stündige Vergärung bei natürlicher Acidität:

	pH	
	A	B
0 Stunden	6,3	6,4
1 Stunde	5,65	5,65

Sodann 6 Stunden Gärung bei  $p_{\text{H}} = 7,5$ .

Zeit Stunden	Alkaliverbrauch ccm 2-n. NaOH		Zuckergehalt der Lösungen in % Reduktion nach Bertrand	
	A	B	A	B
0	0	0	3,64	3,64
1	45	50	2,20	2,25
3	80	75	0,68	0,75
5	95	95	0,35	0,35
7	95	95	0,35	0,34

Totalmenge Zucker vergoren nach 7 Stunden:

19,4 g	19,4 g
--------	--------

Gebildete Kohlensäure. Die Kohlensäureentwicklung wurde in  $\frac{1}{4}$ -Parallelproben verfolgt.

Stunden	ccm CO <sub>2</sub>		Mittel
1	134	144	139 ccm
6	24	—	—
7, nach Austreiben mit H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			7,29
Korrektion für die Selbstgärung			0,47
Entwickeltes CO <sub>2</sub> (Korr.)			<u>6,82 g</u>
	A	B	Mittel
Gebildeter Alkohol (Korr.)	6,85 g	6,78 g	6,81 g
Andere Gärprodukte	4,53 g	—	4,53 g

Ergebnis: Anzahl Prozent des verbrauchten Zuckers.

Gefunden als	A	B	Mittel
Kohlensäure	35,1	—	35,1
Alkohol	35,3	34,9	35,1
Andere Gärprodukte	23,3	—	23,3

Versuch 2.

200 ccm 15%ige Na-Phosphatlösung, neutral

200 ccm Wasser

50 ccm Hefenwasser (20 g in 500 ccm)

150 ccm Glukoselösung (21,8%ig)

600 ccm

15 g Hefe. Temp. 28,3°. 1stünd. Vergärung bei nat. Acidität:

	A	B
0 Stunden $p_H = 6,4$		6,4
$\frac{1}{2}$ Stunde	5,8	—
1 Stunde	5,55	5,5

Sodann 23 Stunden Gärung bei  $p_H = 8,0$ .

Zeit Stunden	Alkaliverbrauch ccm 2-n. NaOH		Zuckergehalt der Lösungen in % Reduktion nach Bertrand	
	A	B	A	B
0	0	0	5,45	5,45
1	42,5	47,5	4,40	4,15
2	62,5	67,5	—	—
3	85	90	2,53	2,30
5	102,5	107,5	1,70	1,63
7	122,5	132,5	—	—
8	—	—	1,13	0,90
11	147,5	152,5	0,69	0,65
24	152,5	157,5	0,45	0,35

	A	B	Mittel
Vergorener Zucker	29,3 g	30,1 g	29,7 g
Gebildete Kohlensäure (Korr.)	10,3 g	10,6 g	10,5 g
Gebildeter Alkohol (Korr.)	8,03 g	8,10 g	8,06 g
Andere Gärprodukte	8,84 g	8,62 g	8,73 g

Ergebnis: Anzahl Prozent des verbrauchten Zuckers.

Gefunden als	A	B	Mittel
Kohlensäure	35,2	35,3	35,2%
Alkohol	27,4	26,9	27,2%
Andere Gärprodukte	30,1	28,6	29,3%

## Versuch 3.

200 ccm 15%ige Na-Phosphatlösung, neutral

200 ccm Wasser

50 ccm Hefenwasser (20 g in 500 ccm)

150 ccm Glukoselösung (21,4%ig)

600 ccm

45 g Hefe. Temperatur 28°.

Zeit Stunden	Alkaliverbrauch ccm 2-n. NaOH (Mittel)	Zuckergehalt der Lösungen in % (Mittel) Reduktion nach Bertrand	PH elektro- metrisch
0	0	5,35	8,9
1	54,5	4,62	—
2	77,5	—	—
3	—	2,30	—
4	101,5	—	—
5	126,5	2,00	9,0
6	161,5	1,80	10,0
9	196,5	1,40	—
12	206,5	1,14	—
23	—	0,98	9,7
29	—	0,80	9,5
36	216,5	—	—
48	—	0,62	9,4
52	—	0,54	—
60	246,5	—	—
72	246,5	0,34	9,3

	A	B
Vergorener Zucker	29,0 g	29,0 g
Gebildete Kohlensäure	9,8 g	9,7 g
Gebildeter Alkohol	8,3 g	8,2 g
Andere Gärprodukte	8,4 g	—

Ergebnis: Anzahl Prozent des verbrauchten Zuckers.

Gefunden als	A	B
Kohlensäure	33,8	33,5
Alkohol	28,6	28,2
Andere Gärprodukte	29,0	—

Versuch 4.

100 ccm Glukoselösung (24,0 %ig)  
 150 ccm Na-Phosphatlösung (15 %ig)  
 50 ccm Hefenwasser (20 g in 500 ccm)  
300 ccm Wasser  
 600 ccm

40 g Brennereihefe. Temperatur 28°.

Gärung 25 Stunden bei  $pH = 8$ .

Alkaliverbrauch: 154 ccm 2-n. NaOH.

Zuckergehalt (nach Bertrand) vor der Gärung: 3,98 %  
 nach „ „ 0,29 %.

Vergorener Zucker . . . . .	21,8 g	% des verbrauchten Zuckers
Gebildete Kohlensäure . . . . .	7,1 g	33
Gebildeter Alkohol . . . . .	7,1 g	33
Andere Gärprodukte . . . . .	5,6 g	26

Versuch 5.

Erhöhte Glukose-Konzentration.

275 ccm Glukoselösung (24,0 %ig)  
 50 ccm Na-Phosphatlösung (15 %ig)  
 35 ccm Hefenwasser (20 g in 500 ccm)  
40 ccm Wasser  
 400 ccm

40 g Brennereihefe. Temperatur 29°.

Alkalische Gärung 30 Stunden bei  $pH = 8$ .

Alkaliverbrauch in A 255, in B 261 ccm 2-n. NaOH.

Zuckergehalt der Lösungen in %:

Stunden	A	B
0 . . . . .	16,5	16,5
8 . . . . .	4,15	4,05
22 . . . . .	1,05	1,00
30 . . . . .	0,78	0,78

Vergorener Zucker . . . . .	60,9 g	60,7 g
Entwickelte Kohlensäure . . . . .	18,2 g	18,15 g
Gebildeter Alkohol . . . . .	15,6 g	16,0 g
Andere Gärprodukte . . . . .	23,3 g	23,1 g

Ergebnis: Anzahl Prozent des verbrauchten Zuckers:

Gefunden als:	A	B
Kohlensäure . . . . .	29,9	29,9
Alkohol . . . . .	26,6	26,4
Andere Gärprodukte . . .	36,7	38,1

Einfluß von Phosphat.

Versuch 6 (G. Hallberg).

30 ccm Hefenwasser  
 50 ccm dest. Wasser  
 20 ccm 22%ige Glukoselösung  
 0,5 ccm Phenolphtaleinlösung  
 10 g Brennereihefe (30% Trockengew.)

Hierzu: Bei Versuch A und B 50 ccm 15%ige Na-Phosphatlösung  
 " " C " D 50 ccm Wasser.

Stunden	A und B. 5 % Phosphat		C und D. Ohne Phosphat	
	ccm 2-n. NaOH	g Glukose	ccm 2-n. NaOH	g Glukose
0	—	4,46	—	4,54
1	8	—	7	—
2	5	—	7	—
3	2,5	—	3,5	—
4	2,4	—	2,1	—
5	0,5	0,54	0,5	0,40

Vergorener Zucker:	3,92 g		4,14 g	
Entwickelt:	g	% vom vergorg Zucker	g	% vom vergorg Zucker
CO <sub>2</sub>	1,32	33,7	1,38	33,3
Alkohol	—	—	1,39	33,6

Versuch 7.

30 ccm Hefenwasser  
 90 ccm dest. Wasser  
 30 ccm 22%ige Glukoselösung  
 0,5 ccm Phenolphtaleinlösung  
 10 g Brennereihefe (30% Trockengew.)

Bei Versuch A u. B enthält diese Mischung: 5 g Dinatriumphosphat (neutr.)  
 " " C " D " " " 2,5 g " "  
 " " E " F " " " 0 g " "

Stunden	A und B 3,3% Phosphat		C und D 1,66% Phosphat		E und F ohne Phosphat	
	ccm		ccm		ccm	
	2-n. NaOH	Glukose	2-n. NaOH	Glukose	2-n. NaOH	Glukose
0	0,5	6,53	0,5	6,53	0,5	6,53
1	4,5	—	4,75	—	5,0	—
2	3,75	3,98	4,0	3,90	4,25	3,57
3	3,25	—	3,0	—	3,75	—
4	3	2,81	3,0	2,66	3,0	2,33

Vergor. Zucker: 3,72 g		3,87 g		4,20 g		
Entwickelt:	g	% vom vergor. Zucker	g	% vom vergor. Zucker	g	% vom vergor. Zucker
CO <sub>2</sub>	1,14	30,6	1,18	30,5	1,30	31,0
Alkohol	1,09	29,3	1,13	29,2	1,24	29,6

Wie aus den Zusammenstellungen der beiden Versuche 6 und 7 hervorgeht, bestätigen unsere Versuche die früheren Befunde von Euler, Tholin und Hammarsten, daß Phosphat bei  $p_{H} = 8$  eine Verzögerung der Gärungsspaltung hervorruft, im Gegensatz zu der in saurer Lösung eintretenden Beschleunigung durch  $PO_4$ .

Was den Grad der genannten Verzögerung betrifft, so ist von vornherein hervorzuheben, daß die Versuchsfehler hier sehr erheblich sein müssen. Neben den verhältnismäßig kleinen Mengen (5—1,6%) Phosphat, welche zur Wirkung kamen, entstehen bei der alkalischen Gärung bedeutende Mengen von Natriumcarbonat aus den kontinuierlichen Zusätzen von NaOH, durch welche die Lösung alkalisch gehalten wird. Bei den Versuchen von Tholin und von Hammarsten wurden die Aciditätsbestimmungen nur kolorimetrisch ausgeführt, ohne elektrometrische Kontrolle; sie haben deswegen nicht ganz den gleichen Grad der Genauigkeit wie die hier angegebenen Versuche. Bei den früheren Arbeiten war auch die Methodik der CO<sub>2</sub>-Bestimmung eine andere. Ein wesentlicher Unterschied der Versuchs-

bedingungen besteht darin, daß Tholin seinen gärenden Lösungen keine Stickstoffnahrung zugesetzt hat, Hammarsten 0,4% Asparagin, während bei unseren Versuchen durch das Hefenwasser eine erheblich kräftigere Stickstoffnahrung — rund 1% Eiweißspaltungsprodukte — sich in der Lösung befand. Jedenfalls finden wir in unseren beiden Versuchsreihen die Verzögerung durch 1,6—5% Phosphat ziemlich gering.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Tholin und Hammarsten finden wir, daß auch bei alkalischer Phosphatgärung mit unserer Oberhefe äquivalente Mengen von Alkohol und Kohlensäure entstehen. Dies gilt, wie erwähnt, für unsere Oberhefe. Von anderen Hefen haben wir in dieser Hinsicht noch eine von unserer Oberhefe morphologisch sehr verschiedene Torula (Hansen) untersucht.

Diese sehr kleinzellige Hefe ist durch die Zellenzahl

$$2,5 \cdot 10^{11} \text{ pro g Trockengewicht}$$

und durch die Inversionskonstante pro Zelle

$$1,1 \cdot 10^{13}$$

(nach der Züchtung in Hefenwasser mit 2% Rohrzucker bei Zimmertemperatur) quantitativ charakterisiert. Die Gärungsgeschwindigkeit in Lösung von normaler Acidität war bei unserer Torula auffallend groß und übertraf sogar die auf Seite 190 für die Oberhefe SB II angegebenen Zahlen<sup>1)</sup>.

Zuerst wurde festgestellt, daß die bei normaler saurer Gärung auftretenden Mengen Alkohol und Kohlensäure auch bei dieser Hefe dieselben waren wie bei den Kulturhefen im allgemeinen.

Es wurde in vier Versuchen gefunden:

g vergorener Zucker	4,24	4,25	4,23	4,27
g gebildete Kohlensäure	1,97	1,98	2,00	2,03
g gebildeter Alkohol	2,02	1,95	1,88	1,90

<sup>1)</sup> O. Svanberg, Enzymatische Untersuchungen einer Torulahefe. Fermentforschung Bd. II, S. 201 (1918).

Dies entspricht etwa 47%  $\text{CO}_2$  und 46%  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  vom vergorenen Zucker. Bei  $p_{\text{H}} = 8,2$  wurden dagegen in einer 7% igen Glukoselösung, welche 4,5% Dinatriumphosphat enthielt, bei der Vergärungstemperatur  $28^\circ$  folgende Gärprodukte gefunden, die in Prozenten des vergorenen Zuckers angegeben sind:

Kohlendioxyd . . . . .	35,9 %
Äthylalkohol . . . . .	32,1 %
Andere Gärprodukte . . . . .	19,4 %

Dies sind aber wiederum fast ganz dieselben Zahlen wie diejenigen, welche für die Oberhefe S B II gefunden und oben angegeben wurden.

Wir finden also das besonders bemerkenswerte Ergebnis, daß bei zwei so verschiedenen Hefen wie einer Brennerei-Oberhefe und einer Torulacee die Alkalinität des Mediums denselben Einfluß auf die Menge der Gärprodukte ausübt.

Wir haben keine Versuche darüber angestellt, in welcher Weise die alkalische Phosphatgärung bei unserer Hefe die Menge und Art der anderen Gärprodukte (Glyzerinfraktion) beeinflußt.

Unsere Messungen der Kohlensäureentwicklung<sup>1)</sup>, welche wir bis in die Nähe des Neutralpunktes fortgesetzt haben, wurden durch einige Versuche, an welchen sich Fräulein Heintze beteiligt hat, bis über den neutralen Punkt hinaus erweitert, indem wir bei dieser Serie die Menge des durch Gärung verbrauchten Zuckers nach Bertrand bestimmten.

Es wurde im 300 ccm-Erlenmeyerkolben gemischt:

40 ccm 8% ige Na-Phosphatlösung, $p_{\text{H}} = 5,3$
50 ccm Hefenwasser (40 g auf 1 Liter)
6 g Glukose.

Die gewünschten  $p_{\text{H}}$ -Werte wurden durch Zusatz von 2-n. NaOH eingestellt. 3 g frische Hefe in 150 ccm Lösung aufgeschlemmt.

<sup>1)</sup> Euler und Heintze, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 7 (1919).

## 5 Stunden Gärung bei 28,5° im Wasserthermostaten:

Zusatz von	A ohne Zusatz	B 2,5 ccm	C 5,0 ccm	D 5,6 ccm 2-n. NaOH	
pH vor der Gärung:	5,3	6,2	7,2	8,3	
Während d. Gärung zuges.	0	1,8 ccm	4,1 ccm	6,2 ccm 2-n. NaOH	
pH nach der Gärung:	4,74	6,18	7,02	8,20	
g vergorener Zucker:		A	B	C	D
nach 3 Stunden . . . . .		2,0	2,1	2,0	1,5
nach 5 Stunden . . . . .		3,0	3,1	3,1	2,2
pH:		5	6,2	7,1	8,25
Rel. Gärungsgeschwindigkeit nach 3 Std.		100	105	100	75
" " " 5 "		100	103	103	73,5

Diese Zahlen ergänzen wir mit folgenden, an der oben erwähnten Torulahefe gewonnenen <sup>1)</sup> Ergebnissen:

pH	I	II	III	III I · II	Relative Geschwindigkeit
	Trocken- gew. der Hefe g	Gärdauer Std.	Vergorene Glukose g		
5-6	1,55	3	2,5	0,54	100
8,4	0,96	9	2,8	0,32	59,3

Wie auch aus der Fig. 1 hervorgeht, ändert sich die Geschwindigkeit des Zuckerverbrauchs, wenigstens in den 5 ersten Gärungsstunden, zwischen  $p_H = 5$  und  $p_H = 7$  nicht.

Was die Kohlensäureentwicklung betrifft, so ist jedenfalls hervorzuheben, daß es uns trotz vielfacher Variationen der Versuchsbedingungen nie gelungen ist, auch nur annähernd die Entwicklung der Kohlensäure aufzuheben, und wir können insofern die von O e l s n e r und A. K o c h <sup>2)</sup> mitgeteilten Versuche als eine Bestätigung unserer früheren Resultate (Ark. f. Kemi, Bd. 7 Nr. 3, 1918) betrachten, welche den genannten Forschern offenbar entgangen sind.

<sup>1)</sup> O. Svanberg, Fermentforschung I. c.

<sup>2)</sup> A. Oelsner und A. Koch, Diese Zeitschr. Bd. 104, S. 175 (1919).

Wie Wilenko zu seinem auffallenden Ergebnis gelangt ist, läßt sich natürlich schwer beurteilen. Der Umstand, daß Wilenko seine Versuche nach eigenen Angaben in den beschränkten Verhältnissen eines Festungsspitals (Deblin) ausführen mußte, gestattet vielleicht an die Möglichkeit zu denken, daß seine gärenden Lösungen stark mit Milchsäurebakterien infiziert waren; man findet darunter sehr alkalitolerante Arten und Stämme, welche sich noch bei  $p_{H} = 8,5$  aus einer geringen nicht ungewöhnlichen Infektion des Ausgangsmateriales gut entwickeln <sup>1)</sup>. Da

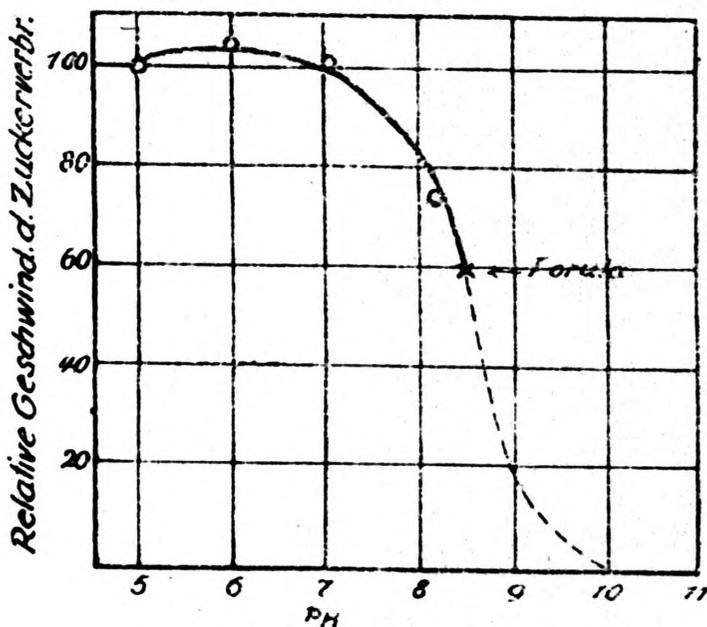


Fig. 1.

Wilenko keine Angaben über eine vorgenommene Prüfung auf Alkohol macht, sondern nur den Verbrauch des Zuckers verfolgt zu haben scheint, so wäre durch Milchsäuregärung das Fehlen von Kohlensäure erklärt.

## 2. Gärung anderer Hexosen.

Zu allen vergleichenden Gärungsversuchen an Zymohexosen kam folgende Reaktionslösung zur Anwendung:

<sup>1)</sup> Siehe O. Svanberg, Über einige milchsäurebakteriologische  $p_{H}$ -Bestimmungen, Akad. Abhandlung, Stockholms Högskola, 1918.

30 ccm Hefenwasser . . . . .	} pH = 8
120 ccm destilliertes Wasser . . . . .	
7,5 g Dinatriumphosphat . . . . .	
0,5 ccm Phenolphthaleinlösung . . . . .	
4,4 bzw. 4,5 g Hexose (siehe Tabellen) . . . . .	

In 150 ccm dieser Lösung wurden 10 g Hefe vom Trockengewicht 30% suspendiert.

### Versuch 8 (Glukose-Fruktose).

Stunden	Mittelwerte		Mittelwerte	
	ccm 2-n. Na OH	g Glukose	ccm 2-n. Na OH	g Fruktose
0	—	4,40	—	4,40
1	3,8	—	4,5	—
2	5,6	—	5,5	—
3	2,9	—	3,2	—
4	1,7	—	2,5	—
5	1,6	0,70	1,6	0,90

Vergorener Zucker:	3,70 g		3,50 g	
Entwickelt:	g	% vom vergor. Zucker	g	% vom vergor. Zucker
CO <sub>2</sub>	1,22	33,0	1,23	35,5
Alkohol	—	—	1,11	32,1

### Versuche 9, A und B (Glukose-Mannose).

A

Stunden	Mittelwerte		Mittelwerte	
	ccm 2-n. Na OH	g Glukose	ccm 2-n. Na OH	g Mannose
0	1,0	4,44	1,0	4,44
1	6,7	—	3,0	—
2	5,0	2,18	2,0	3,07
3	2,0	—	1,5	—
4	2,0	0,74	2,0	1,91

Vergorener Zucker:		3,70 g		2,53 g	
Entwickelt:	g	% vom vergor.Zucker	g	% vom vergor.Zucker	
CO <sub>2</sub>	1,15	31,1	0,78	30,8	
Äthylalkohol	1,16	31,4	0,77	30,6	

## B

Stunden	Mittelwerte		Mittelwerte	
	ccm 2-n. Na OH	g Glukose	ccm 2-n. Na OH	g Mannose
0	0,5	4,16	0,5	4,16
1	4,25	—	3,25	—
2	4,25	2,39	2,0	2,89
3	3,5	—	2,0	—
4	2,0	1,63	1,5	2,46

Vergorener Zucker:		2,53 g		1,70 g	
Entwickelt:	g	% vom vergor.Zucker	g	% vom vergor.Zucker	
CO <sub>2</sub>	0,86	34,0	0,63	37,0	
Äthylalkohol	0,81	32,0	0,59	34,7	

## Versuch 10 (Glukose-Galaktose).

Stunden	Mittelwerte		Mittelwerte	
	ccm 2-n. Na OH	g Glukose	ccm 2-n. Na OH	g Galaktose
0	0,5	4,54	0,5	4,54
1	4,5	—	1,0	—
2	6,5	1,97	0,5	4,03
3	2,5	—	0	—
4	3,0	1,23	0	4,03

Vergorener Zucker:		3,31 g		(0,51 g)	
Entwickelt:	g	% vom vergor.Zucker	g		
CO <sub>2</sub>	1,05	31,7	0,11	—	
Äthylalkohol	1,04	31,4	0,09	—	

Man bemerkt in der obigen Tabelle, daß bei dem Versuch mit Galaktose die Reaktion nach 2 Stunden aufhört. Man sollte erwarten, daß, wenn Galaktose durch unsere Hefe in schwach alkalischer Lösung überhaupt vergoren wird, gerade umgekehrt die Vergärung erst nach einiger Zeit kräftiger einsetzt. Wir nehmen deshalb an, daß die kleine anfängliche Gärung im Galaktoseversuch zu einem wesentlichen Teil von einer Verunreinigung des Präparates mit Glukose herrührt, um so mehr, als die nachträgliche Prüfung mit einem kleinen Rest des gleichen Präparates im Polarisationsapparat eine zu niedrige Drehung zeigte.

Setzen wir die 4 Stunden vergorenen Glukosemengen = 100, so ergeben sich für die übrigen Hexosen die folgenden Werte:

Glukose . . . . .	100
Fruktose . . . . .	95
Mannose . . . . .	70
Galaktose . . . . .	< 5

Wir finden also, daß die Unterschiede in der Vergärungsgeschwindigkeit zwischen Glukose und Fruktose fast in die Versuchsfehlergrenze fallen, jedenfalls sehr gering sind. Bei normaler Acidität werden bekanntlich Glukose und Fruktose ebenfalls annähernd gleich schnell vergoren, und zwar auch unter ungünstigen Gärungsbedingungen.

Die Vergärung der Mannose erfolgt dagegen bei  $p_{H} = 5$  ausgesprochen langsamer als diejenige der Glukose. Dies erinnert an das interessante Ergebnis von A. S l a t o r<sup>1)</sup>, daß Mannose, welche durch normale Hefe gleich schnell oder sogar etwas schneller vergoren wird als Glukose<sup>2)</sup>, nach Abschwächung der Hefe durch Erhitzen viel langsamer gespalten wird als die Glukose. Euler und L u n d e q v i s t<sup>3)</sup> fanden, daß die Gärung der Mannose bei normaler Acidität durch Phosphat im Gegensatz zur Glukose nicht beeinflußt wird. Alle diese Beobachtungen deuten, wie frü-

<sup>1)</sup> A. Slator, Journ. Chem. Soc. Bd. 93, S. 217 (1908).

<sup>2)</sup> E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. Bd. 76, S. 600 (1905).

<sup>3)</sup> Euler und Lundeqvist, Diese Zeitschr. Bd. 72, S. 97 (1911).

her erwähnt, darauf hin, daß die bei der Vergärung von Mannose eintretenden Zwischenreaktionen teilweise andere sind als diejenigen, welche bei der Gärung der Glukose stattfinden.

### 3. Hydrolyse und Gärung von Biosen.

#### Gärungsverlauf.

Zu den Versuchen 11—15 benutzten wir folgende Reaktionslösung:

30 ccm Hefenwasser,  
120 ccm Wasser,  
7,5 g Dinatriumphosphat,  
0,5 ccm Phenolphthaleinlösung,  
ca. 4,5 g Zucker.

In 150 ccm dieser Mischung wurden 10 g Hefe (Trockengew. 30%) aufgeschlemmt.

Als Einleitung zum Studium der alkalischen Rohrzuckervergärung sei der folgende Vorversuch mit Invertzucker angegeben:

Stunden	Mittelwerte		Mittelwerte	
	ccm 2-n. NaOH	g Glukose	ccm 2-n. NaOH	g Invertzucker
0	0,5	4,44	0,5	4,44
1	3,5	—	3,5	—
2	4,5	2,16	3,25	2,17
3	3,25	—	4,0	—
4	2,25	1,41	2,0	1,40

Vergorener Zucker:		3,03 g	3,04 g	
Entwickelt:	g	% vom vergor. Zucker	g	% vom vergor. Zucker
CO <sub>2</sub>	1,03	34,0	1,10	36,2
Äthylalkohol	1,02	33,7	0,98	32,2

Wie zu erwarten war, wird also der Invertzucker auch bei  $p_H = 8$  ebenso schnell vergoren, wie seine Komponenten einzeln.

## Versuch 11 (G. Hallberg).

Stunden	Mittelwerte		Mittelwerte	
	ccm 2-n. NaOH	g Glukose	ccm 2-n. NaOH	g Rohrzucker
0	—	4,40	—	4,40
1	6,0	—	1,5	—
2	3,0	—	1,8	—
3	3,6	—	5,5	—
4	1,6	1,23	5,0	0,82 <sup>1)</sup>

Vergorener Zucker:	3,17 g	—
Entwickelt:	g	% v. vergor. Zucker
CO <sub>2</sub>	1,14	36,0
Äthylalkohol	1,20	37,9

## Versuch 12 (Svanberg).

Stunden	Mittelwerte		Mittelwerte		Polarisation
	ccm 2-n. NaOH	g Glukose	ccm 2-n. NaOH	g Rohrzucker	
0	0,5	4,44	0,5	4,44	—
1	5,5	—	2,0	—	+ 0,59
2	6,0	2,27	4,0	0,95 <sup>2)</sup>	+ 0,46
3	3,0	—	3,8	—	+ 0,31
4	1,5	1,33	2,7	0,23 <sup>2)</sup>	+ 0,24

Vergorener Zucker:	3,11 g
Entwickelt:	g
CO <sub>2</sub>	1,13
Äthylalkohol	1,19

<sup>1)</sup> Invertzucker, bestimmt nach Bertrand. Außer dem Invertzucker enthielt die Lösung noch uninvertierten Rohrzucker.

<sup>2)</sup> Invertzucker, nach Bertrand bestimmt. Daß die Lösung außerdem noch uninvertierten Rohrzucker enthält, geht aus den in der letzten Spalte angegebenen positiven Drehungswerten hervor.

Versuch 13 (Heintze). (pH = 8,3—8,5.)

Stunden	Mittelwerte		Mittelwerte	
	ccm 2-n. NaOH	Glukose %	ccm 2-n. NaOH	Zucker %
0	0,5	3,1	0,5	3,2 (Rohrz.)
1	7,2	1,8	5,2	—
2	6,0	0,9	4,1	—
3	2,6	0,5	5,4	—
4	0,2	0,1	2,8	0,44 (Invertz.)

Vergorener Zucker:	—	4,32 g
Entwickelter Äthylalkohol:	—	1,39 g = 32,2%

Berechnet man die Mittelwerte für die innerhalb 4 Stunden gebildeten Mengen Alkohol und Kohlensäure aus den beiden Versuchen 11—12 — die Versuchsreihe 13 ist mit etwas größeren Zuckermengen angestellt —, so ergeben sich folgende Zahlen:

	Glukose	Invertzucker	Rohrzucker
Entwickelt CO <sub>2</sub>	1,14	1,10	1,14
Alkohol	1,20	0,98	1,20

Bei der Versuchsreihe 13 ist die Alkoholausbeute nur für den Rohrzuckerversuch bestimmt worden, wir können uns hier an die Menge der zur Neutralisation der Kohlensäure verbrauchten Natronlauge halten; dieselben betragen, ausgedrückt in ccm 2-n. Natronlauge in

Versuch 13

Glukose	Rohrzucker
16,0	17,5

Vorversuch

Glukose	Invertzucker
14	13,25

Es ergibt sich also, daß bei der untersuchten Alkalinität die Inversion des Rohrzuckers genügend schnell erfolgt, um zu ermöglichen, daß Rohrzucker ebenso rasch vergoren wird als Glukose bzw. Invertzucker.

Versuche 14 und 15 (Laktose und Maltose).

Die beiden mit Laktose und mit Maltose angestellten Versuchsreihen können wir in eine Tabelle zusammenfassen. Die Parallelversuche mit Glukose zeigten, daß die Hefe in jedem Fall die normale Gärkraft besaß.

Stunden	Mittelwerte		Mittelwerte	
	ccm 2-n. NaOH	g Laktose	ccm 2-n. NaOH	g Maltose
0	0,5	4,44	0,5	4,44
1	1,0	—	0,5	—
2	0	—	0,5	—
3	0,5	—	0	—
4	0	—	0	—
	unkorr.	korr.	unkorr.	korr.
Entwickelt CO <sub>2</sub>	0,16	0,06	0,13	0,03
Äthylalkohol	0,16	0,06	0,14	0,04

Die direkt gefundenen Mengen CO<sub>2</sub> und Äthylalkohol sind wegen der Selbstgärung der Hefe zu korrigieren. Die sich dann ergebenden kleinen Mengen der gebildeten Gärungsprodukte dürften teils von geringen Verunreinigungen der Biosen mit Glukose herrühren, teils von dem Umstand, daß die Selbstgärung der zu diesen Versuchen angewandten Hefe etwas höher war.

Daß die Laktose bei der untersuchten Alkalinität nicht vergoren wird, war zu erwarten, da diese Biose auch in schwach saurer Lösung von Hefe, infolge Abwesenheit von Laktase, nicht angegriffen wird.

Unser Befund, daß Maltose bei  $p_{H} = 8$  nicht vergoren wird, zeigt, daß Maltase, welche ja stets in Oberhefe vorhanden ist, bei dieser Alkalinität nicht wirksam ist. Das

Optimum der Wirkung der isolierten Maltase aus Bierhefe liegt nach Michaelis und Rona<sup>1)</sup> bei  $p_{H} = 6,1$  bis 6,8. Der Abfall der Wirkung außerhalb dieser Grenzen ist nach Angabe der genannten Forscher sehr stark. „Dieser Abfall ist viel steiler, als es bei allen bisher von uns untersuchten Fermenten der Fall war.“

Dies steht also in bester Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen an lebenden Zellen. Insbesondere ist der Unterschied gegen Invertase zu betonen, welche, obwohl ihr Wirkungsoptimum bei viel höherer Acidität liegt, doch bei einer Alkalinität noch katalysiert, bei welcher die Maltase schon völlig inaktiv ist.

Der Umstand, daß sich Maltase und Invertase hinsichtlich ihrer Alkaliempfindlichkeit wesentlich unterscheiden, gibt ein Mittel an die Hand, Rohrzucker und Maltose in Lösung biologisch zu trennen. Man bringt die Lösung der beiden Biosen auf  $p_{H} = 8$ , so wird durch eine geeignete Oberhefe der Rohrzucker auswählend vergoren, während die Maltose erhalten bleibt.

### Inversionsversuche.

Nachdem die vergleichenden Versuche zwischen der Vergärung der Glukose und des Rohrzuckers das Resultat ergeben hatten, daß bei der untersuchten Alkalinität die beiden Zuckerarten gleich schnell vergoren werden, wurde die Inversion des Rohrzuckers in schwach alkalischer Lösung bei Gegenwart von Phosphat untersucht.

Vor der Einführung der exakten  $p_{H}$ -Messungen lagen folgende Angaben in der Literatur vor:

O'Sullivan und Tompson<sup>2)</sup>, welchen wir die ersten gründlichen Studien an Invertase verdanken, haben auch den Einfluß von Alkali untersucht und schreiben: „The caustic alkalis, even in very small proportions, are instantly and irretrievably fatal to the reaction.“ Unter den folgenden

<sup>1)</sup> Michaelis und Rona, Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 (1913).

<sup>2)</sup> O'Sullivan und Tompson, Journ. Chem. Soc. London Bd. 57, S. 852 (1890).

größeren Untersuchungen über die Kinetik der Invertase wäre zunächst diejenige von H e n r i zu nennen, welche aber bekanntlich dadurch, daß dieser Autor weder auf die Multirotation der Hexosen noch auf die Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion von der Konzentration der Wasserstoffionen Rücksicht genommen hat, nicht verwertet werden kann. Ein wesentliches Verdienst, auf diese beiden Faktoren erneut die Aufmerksamkeit gelenkt zu haben, gebührt zweifellos H u d s o n <sup>1)</sup>, welchem wir die Aufklärung der Vorgänge bei der Multirotation verdanken. Mit P a i n e <sup>2)</sup> hat er besonders den Einfluß der Säuren und Alkalien auf die Aktivität der Invertase untersucht. Bezüglich der Alkaliwirkung kommt H u d s o n zum Resultat: „If a strongly active solution of invertase is made faintly alkaline to litmus and some cane sugar is dissolved in it, no inversion of the sugar occurs even after several hours.“

Durch die beiden von S ö r e n s e n und von M i c h a e l i s <sup>3)</sup> und ihre Mitarbeiter für biochemische Zwecke ausgearbeiteten äußerst genauen und zweckmäßigen Methoden zur Bestimmung der Wasserstoffionen sind die Messungen auf diesem Gebiet auf eine exaktere Grundlage gestellt worden.

S ö r e n s e n und M i c h a e l i s haben selbst die genannten Methoden, besonders die elektrometrische, auf Invertase angewandt und die Beziehungen zwischen der Konzentration der Wasserstoffionen und der Aktivität der Invertase festgestellt. Die Messungen von S ö r e n s e n erstrecken sich bis zum Neutralpunkt (eine Angabe bezieht sich auf  $p_H = 7,3$ ). Dagegen haben M i c h a e l i s und D a v i d s o h n <sup>4)</sup> ihre Untersuchung bis zu  $p_H = 8,5$  aus-

<sup>1)</sup> C. S. Hudson, Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 30, S. 1160 u. 1564 (1908).

<sup>2)</sup> Hudson und Paine, Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 32, S. 774 (1910).

<sup>3)</sup> S. P. L. Sørensen, Comptes rendus Carlsberg Bd. 8, S. 1 (1909) und Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 131 (1909). Siehe auch Asher-Spiros Ergeb. d. Physiol. Bd. 12, S. 393 (1912).

<sup>4)</sup> Michaelis und Davidsohn, Biochem. Zeitschr. Bd. 35, S. 386 (1911). — Michaelis und Menten, ebenda Bd. 49, S. 333 (1913). — Michaelis, ebenda Bd. 60, S. 91 (1914).

gedehnt und die Kurve, welche die Beziehung zwischen  $p_{H}$  und Aktivität darstellt, bis zum 0-Wert der Aktivität ausgezogen. Es war für uns um so mehr von Bedeutung, uns von der Genauigkeit dieser Messungen zu überzeugen, als, wie erwähnt, frühere Angaben in entgegengesetzter Richtung gingen.

In schwach saurer Lösung kann die dem gesammten Invertasegehalt der Hefezellen entsprechende Inversionsfähigkeit der lebenden Zellen quantitativ ermittelt werden<sup>1)</sup>. In analoger Weise haben wir die invertierende Wirkung dieser Zellen bei Alkalinitäten bis  $p_{H} = 8,5$  untersucht.

Die Temperatur war auch bei diesen Versuchen  $28^{\circ}$ . Die optische Drehung bezieht sich auf das Licht einer Quecksilberlampe.

Versuch 16.

0,1 g frische Hefe (31% Trockensubst.) in 101 cem der folgenden Lösungen suspendiert:

75 cem 13,4%ige Rohzuckerlös.	75 cem 13,4%ige Rohzuckerlös.
25 cem 16%ige $Na_2HPO_4$ -Lös.	25 cem 10%ige $Na_2HPO_4$ -Lös.
1,06 cem 30%ige $H_3PO_4$	1 cem Wasser
<hr/> 101,06 cem	<hr/> 101 cem
$p_{H}$ { vor dem Versuch: 5,07	$p_{H}$ { vor dem Versuch: 7,84
{ nach „ „ 4,67	{ nach „ „ 7,50

Minuten	$p_{H} = 4,8$		$p_{H} = 7,7$	
	Drehungsgrade 5 cm-Rohr	Inversions- konstante $k \cdot 10^5$	Drehungsgrade 5 cm-Rohr	Inversions- konstante $k \cdot 10^5$
0	1,63	—	1,64	—
15	1,58	67	—	—
30	1,53	67	—	—
45	1,48	67	—	—
60	1,42	73	1,62	6,5
90	1,35	65	—	—
120	1,28	63	1,59	8,2
$\infty^2)$	— 0,59	—	— 0,59	—
		<hr/> Mittel: 67		<hr/> Mittel: 7,3

<sup>1)</sup> Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 71, S. 14 (1911).

<sup>2)</sup> Berechnet aus der Gleichung: Maximale Linksdrehung = Maximale Rechtsdrehung  $(0,44 - 0,005 t)$ .  $t = 16^{\circ}$ .

Da schon bei diesem Versuch die absoluten Werte des Drehungsrückganges recht gering waren, mußte im folgenden, bei höherer Alkalinität angestellten Versuch mit der 10fachen Hefemenge gearbeitet werden.

## Versuch 17.

Demgemäß wurden 10 g frische Hefe in 150,5 ccm der folgenden Lösung suspendiert:

100 ccm	5%ige Rohrzuckerlösung
50 ccm	10%ige $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung
0,5 ccm	1%ige Phenolphthaleinlösung
<u>150,5 ccm</u>	

$$\text{pH} = 8,5.$$

Bei optimaler Acidität wird bekanntlich die Inversionsfähigkeit von Hefezellen durch die Gegenwart von Toluol nicht beeinflußt. Dies gilt auch für schwach alkalische Lösungen (siehe folgendes Kapitel). Es wurde also in diesem Versuch die Gärung durch Toluolzusätze unterdrückt, um die Inversion mehr hervortreten zu lassen. Es wurden zugesetzt:

Zu Versuch A: 1 ccm	} Toluol.
Zu Versuch B: 2 ccm	

Stunden	1 ccm Toluol			2 ccm Toluol		
	ccm 2-n. NaOH	Reduzierb. Zucker in %	$k \cdot 10^4$	ccm 2-n. NaOH	Reduzierb. Zucker in %	$k \cdot 10^4$
0	0,5	0,35	—	0,5	0,35	—
1	1,2	—	—	1,1	0,89	14
2	0,2	1,65	19	0,3	1,53	17
3	0,0	—	—	0,1	1,89	16
4	0,0	1,89	12	0,1	2,16	15
5	0,0	2,42	15	0,0	2,42	15
6	0,1	—	—	0,1	—	—
25	0,2	3,40	—	0,2	3,48	—
$\infty$	—	3,52	15	—	—	15

#### 4. Giftwirkung auf lebende Hefe in alkalischer Lösung.

Nach Versuchen von N. Florell.

Die Giftwirkung in alkalischer Lösung wurde in erster Linie in methodischer Hinsicht untersucht, um zu sehen.

durch welche Zusätze die Wirkung der Invertase von den Gärungsreaktionen isoliert werden kann. Es war von vornherein zu erwarten, daß sich zwischen den Giftwirkungen in saurer und alkalischer Lösung Ungleichheiten zeigen werden. Bei  $p_{\text{H}} = 8$  sind diejenigen Giftstoffe, welche sauren Charakter besitzen, in Form von Salzen anwesend, die sehr schwach sauren Stoffe, wie Phenole usw., allerdings teilweise hydrolysiert. Da die Giftwirkung einer Substanz in erster Linie davon abhängt, ob dieselbe in die Zellen eindringen kann, so wird ohne weiteres verständlich, daß beispielsweise die Salicylsäure in saurer Lösung vergiftet, in alkalischer Lösung dagegen unwirksam ist.

Abgesehen von dieser chemischen Veränderung, welche ein Giftstoff durch die Alkalinisierung der Lösung erfährt, kann die Plasmaschicht der Zellen durch Überschuß freier H- oder OH-Ionen hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit selbst verändert werden.

Wir geben nun zunächst die von N. Florell ausgeführten Versuche an<sup>1)</sup>.

Versuchsbedingungen: Bei allen in diesem Kapitel erwähnten Versuchen wurden 10 g frische Hefe von durchschnittlichem Trockengewicht 30% in 175,5 ccm folgender Lösung aufgeschwemmt, welche während der Gärungen durch kleine Alkalizusätze auf konstanter Alkalinität gehalten wurden. Gärungstemperatur 28°.

110	ccm 6,8%ige Glukose- bzw. Invertzuckerlösung
40	ccm 10%ige Natriumphosphatlösung
25	ccm Hefenwasser
	<u>0,5 ccm Phenolphthaleinlösung</u>
175,5	ccm

$$p_{\text{H}} = 8,0.$$

In diese Lösung wurden die Giftstoffe in fester Form eingewogen. Der vergorene Zucker ist nach der Reduktions-

<sup>1)</sup> Einige Angaben hierüber finden sich bereits in Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 7, No. 3 (1918).

methode von Bertrand bestimmt. Sämtliche Zahlen sind Mittelwerte aus wenigstens 2 Versuchen. In den Tabellen sind neben den vergorenen Zuckermengen in g auch die Mengen der gebildeten Gärprodukte angegeben, und zwar in Gramm und in Prozenten des vergorenen Zuckers.

Versuch 18 (Chloroform).

Bekanntlich hemmen Protoplasmagifte wie Toluol, Chloroform, Thymol usw. die Gärung der lebenden Hefe bei normaler Acidität in hohem Grad, nur die Wirkung der freien Zymase bleibt bestehen. Daß Toluol auch bei alkalischer Reaktion die Gärung herabdrückt, zeigte sich bereits beim vorhergehenden Versuch 17.

g vergorener Zucker.

Stunden	Ohne Zusatz	Chloroform			
		0,05 ccm	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm
2	3,07	2,7	2,5	2,2	1,3
4	4,70	4,1	3,9	3,6	2,8

Nach diesen Ergebnissen wird die alkalische Gärung durch die angewandten Mengen Chloroform, etwa 0,2%, noch keineswegs ganz aufgehoben. Andererseits ist auch bei sehr kleinen Zusätzen, 0,02%, keine Aktivierung bemerkbar.

Jodoform zeigte einen ähnlichen, aber noch etwas schwächeren Effekt. Ein Zusatz von 0,2% verringerte in 2 Stunden die Gärungsgeschwindigkeit um etwa 10%.

Versuch 19 (Acetaldehyd).

Wegen der vielfachen Beziehungen des Acetaldehyds zu den Gärungsvorgängen wurde auch ein Versuch über die Einwirkung auf die alkalische Gärung angestellt. Bei der schwachen Alkalinität  $p_H = 8$  ist nicht zu befürchten, daß in 2—4 Stunden ein wesentlicher Teil des Acetaldehyds durch das Alkali verändert wird.

Stunden	2 g Acetaldehyd			Ohne Zusatz		
	vergor. Zucker	gebild. CO <sub>2</sub>		vergor. Zucker	gebild. CO <sub>2</sub>	
	g	g	% v. vergor. Zucker	g	g	% v. vergor. Zucker
2	1,21	—	—	2,51	—	—
4	2,62	0,84	32,0	3,68	1,22	34,4

Durch etwa 1% Acetaldehyd wird also die alkalische Gärung nicht unwesentlich gehemmt. Eine solche Hemmung macht sich auch in saurer Lösung geltend<sup>1)</sup>.

Versuch 20 und 21 (Milchsäure und Chloressigsäure).

Erstere Substanz wurde wegen ihrer wichtigen Rolle bei der biologischen Zuckerspaltung untersucht.

Stunden	2 g Na-Laktat			Ohne Zusatz		
	vergor. Zucker	gebild. CO <sub>2</sub>		vergor. Zucker	gebild. CO <sub>2</sub>	
	g	g	% v. vergor. Zucker	g	g	% v. vergor. Zucker
2	3,05	—	—	3,22	—	—
4	5,15	1,46	28,4	5,21	1,42	27,2

Der Zusatz von Laktat erwies sich also bei  $p_{11} = 8$  ohne wesentlichen Einfluß auf die Gärungsgeschwindigkeit der Glukose. Bei normaler Acidität tritt bekanntlich eine Beschleunigung ein.

Chloressigsäure lieferte ein ganz analoges Ergebnis; wir sehen deswegen von der Wiedergabe der Zahlen ab.

Versuch 22 und 23 (Adrenalin und Thyrrhoeidea-Extrakt).

In diesem Zusammenhang seien 2 Versuche mitgeteilt, welche in Rücksicht auf vermutete physiologische Beziehungen angestellt wurden.

<sup>1)</sup> Euler u. Sahlén. Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 3. S. 225 (1913).

g vergorener Zucker.

Stunden	Ohne Zusatz	0.005 g Suprarenin	5 ccm Thyrrhoeidea-Extrakt
2	2,35	2,37	2,27
4	3,82	3,94	3,75

Eine deutliche Wirkung konnte weder beim Adrenalin noch beim wässrigen Extrakt der Schilddrüse eines Schafes festgestellt werden.

## Versuch 24.

Zusatz	Nach 2 Stunden					Nach 4 Stunden				
	Vergor. Zucker	CO <sub>2</sub>		Alkohol		Vergor. Zucker	CO <sub>2</sub>		Alkohol	
	g	g	$\frac{0}{100}$ V. Z.	g	$\frac{0}{100}$ V. Z.	g	g	$\frac{0}{100}$ V. Z.	g	$\frac{0}{100}$ V. Z.
Ohne Zusatz	1,79	—	—	—	—	2,90	1,03	35,6	0,97	33,4
Anilin { 0,5 ccm	1,08	—	—	—	—	1,42	0,49	34,8	0,45	32,1
{ 1,0 ccm	0,35	—	—	—	—	0,66	0,24	36,3	0,23	34,8
{ 2 ccm	0,18	—	—	—	—	0,26	—	—	—	—
Ohne Zusatz	1,95	—	—	—	—	2,66	—	—	—	—
Pyridin { 1 ccm	1,89	—	—	—	—	2,40	—	—	—	—
{ 2 ccm	0,75	—	—	—	—	1,24	0,41	33,2	—	—

Anilin ist im allgemeinen ein ziemlich wirksames Enzym- und Protoplasmagift; seine erhebliche Wirkung macht sich auch hier geltend; wie aus der Tabelle ersichtlich, wird durch rund 1% Anilin die Gärkraft der Hefe um 75% ihres Wertes vermindert. Vergl. auch Fig. 2 S. 220.

Bedeutend weniger wirksam erweist sich Pyridin.

## Versuch 25 (Na-Salicylat).

Stunden	2 g Na-Salicylat					Ohne Zusatz				
	Vergor. Zucker	CO <sub>2</sub>		Alkohol		Vergor. Zucker	CO <sub>2</sub>		Alkohol	
	g	g	$\frac{0}{100}$ V. Z.	g	$\frac{0}{100}$ V. Z.	g	g	$\frac{0}{100}$ V. Z.	g	$\frac{0}{100}$ V. Z.
2	1,63	—	—	—	—	1,47	—	—	—	—
4	3,34	1,26	37,7	1,17	34,2	3,11	1,15	37,0	—	—

Durch den Zusatz von 2 g — rund 1,1% — Salicylat wird also eine kleine Beschleunigung der Gärwirkung erzielt, welche die Versuchsfehlergrenze etwas überschreitet. Ein Versuch mit 1 g Salicylat und der doppelten Hefemenge gab ein ähnliches Resultat. Im Gegensatz hierzu wird die normale Gärung durch freie Salicylsäure stark, nach Wehmer<sup>1)</sup> schon in einer Konzentration von 0,1% vollständig gehemmt. Auch nach Will<sup>2)</sup> und Schulz ist die Wirkung der Salicylsäure auf Hefen sehr erheblich.

## Versuch 26 (Resorcin).

Stunden	2 g Resorcin					Ohne Zusatz				
	Vergor. Zucker		CO <sub>2</sub>		Alkohol	Vergor. Zucker		CO <sub>2</sub>		Alkohol
	g	g	"V. Z.	g	"V. Z.	g	g	"V. Z.	g	"V. Z.
2	0,86	—	—	—	—	2,72	—	—	—	—
4	1,29	0,35	31,4	0,34	30,5	4,40	1,40	31,8	1,35	30,7

Durch etwa 1% Resorcin wird also bei  $p_{\text{H}} = 8$  die Gärwirkung auf rund  $\frac{1}{3}$  ihres Wertes herabgedrückt. Dies entspricht recht angenähert der Hemmung, welche auch bei normaler Gärung durch die gleiche Resorcinkonzentration hervorgerufen wird<sup>3)</sup>. Daß hier keine großen Unterschiede zwischen den Wirkungen bei  $p_{\text{H}} = 8$  und  $= 5$  auftreten, ist verständlich, da Resorcin eine sehr schwache Säure<sup>4)</sup> ist (Dissociationskonstante  $K = 3,6 \cdot 10^{-10}$ ), deren Natriumsalz also stark hydrolysiert sein muß.

## Versuch 27 (Phenol).

g vergorener Zucker.

Stunden	Ohne Zusatz	Phenol			
		0,05 g	0,10 g	0,20 g	0,41 g
2	3,00	2,95	2,76	2,58	2,05
4	4,46	4,28	4,07	3,72	2,82

<sup>1)</sup> Wehmer, Chem. Ztg. Bd. 21, S. 73 (1897).

<sup>2)</sup> Will, Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Bd. 17, S. 61 (1894).

<sup>3)</sup> H. Euler u. Beth Euler, Fermentforschung Bd. 1, S. 465 (1916).

<sup>4)</sup> Euler u. Bolin, Zeitschr. f. physikal. Chem. Bd. 66, S. 71 (1909).

Die Versuche sind leider nicht auf größere Phenolkonzentrationen ausgedehnt worden, so daß die Wirkungen mit denen des Resorcins nicht genau verglichen werden können. Sehr groß scheint der Unterschied zwischen den Wirkungen beider Stoffe bei  $p_H = 8$  nicht zu sein.

Versuch 28 (Na-Pikrat).  
g vergorener Zucker.

Stunden	Ohne Zusatz	Pikrinsäure			
		0,125	0,25	0,50	1,00
2	3,20	3,35	3,20	2,35	1,76
4	4,56	4,28	4,18	3,95	3,20

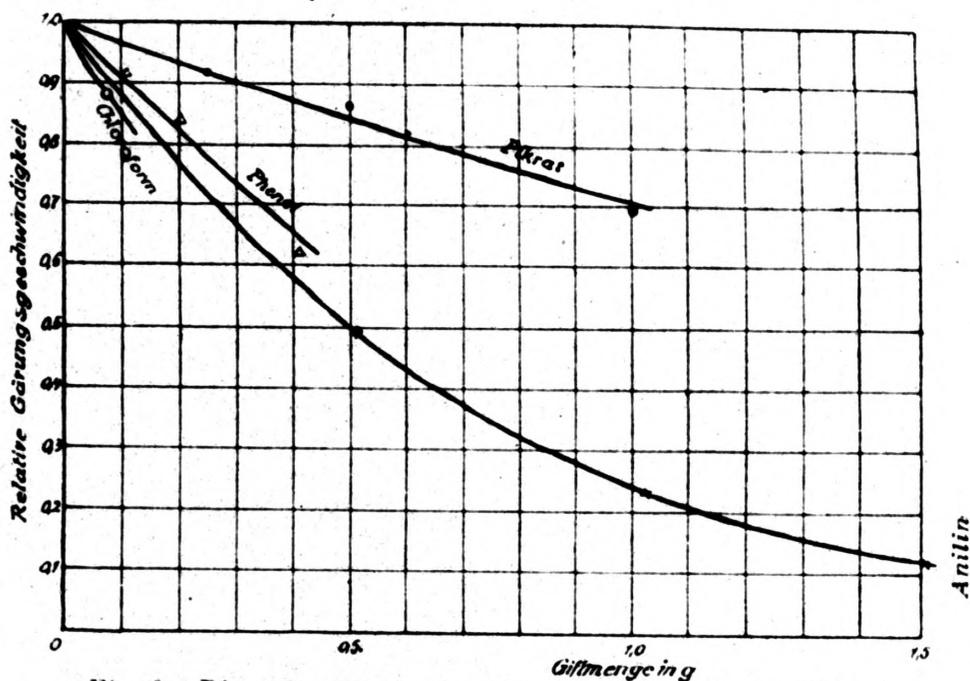


Fig. 2. Die unbez. Kurve bezieht sich auf Anilin (S. 218).

Versuch 29 (Na-Thiosulfat).

Ohne deutliche Wirkung auf die alkalische Gärung ist in den Konzentrationen 1,5% und 0,5% Natriumthiosulfat, wie folgende Zahlen zeigen:

g vergorener Zucker.

Stunden	Ohne Zusatz	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	
		1 g	3 g
2	1,33	1,30	1,27
4	2,24	2,30	2,21

**D. Verlauf der Zuckerspaltung durch Trockenhefe bei  $p_{\text{H}} = 8$ .**

Die Gärtätigkeit der Hefe wird, worauf Euler und auf Ugglas die Aufmerksamkeit gelenkt haben, nur zu einem sehr kleinen Teil von der freien Zymase, bezw. dem freien Zymasekomplex, der Hauptsache nach vielmehr vom Protoplasma vermöge der an dasselbe gebundenen Enzymgruppen vermittelt. Darauf deuten in erster Linie die wesentlichen Verschiedenheiten, welche sich bei der Einwirkung von Protoplasmagiften auf einerseits frische, andererseits auf durch Trocknung getötete Hefezellen ergeben. Hierbei ist gleich zu betonen, daß „Dauerhefe“ oder „Trockenhefe“ in je nach der Art der Trocknung sehr verschiedenem Grad fort-pflanzungsfähige Zellen enthält, welche sich gegenüber Protoplasmagiften ähnlich wie frische Zellen verhalten. Derartige „Dauerpräparate“ zeichnen sich durch eine hohe Gärkraft aus.

Die folgenden Versuche von phil. mag. E. Moberg sind mit solchen sehr gärkräftigen Trockenpräparaten ange-stellt <sup>1)</sup>.

Bezüglich der Versuchsanordnung ist folgendes zu er-wähnen: Die Versuchslösung betrug jedesmal 150 ccm und wurde folgendermaßen zusammengesetzt:

- 20 ccm Glukoselösung, enthaltend 4,36 g Glukose.
- 50 ccm Natriumphosphatlösung. 10 %ig.
- 80 ccm Wasser.

Hierzu:

- 10 g frische Hefe bzw. die entsprechende Menge.
- ca. 3 g (genau bestimmt durch Analyse) getrocknete Hefe.

Die Trocknung der Hefe geschah während 24 Stunden bei Zimmertemperatur, 16°; sie hatte dann einen durch-schnittlichen Wassergehalt von 10%. Versuchstemperatur bei diesen Versuchen 27°.

Es ist noch besonders zu bemerken, daß die täglichen Schwankungen der Gärkraft der Hefe ziemlich bedeutend

<sup>1)</sup> Vgl. Euler und Moberg. Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 7 Nr. 12 (1918).

sind. Es sind deshalb nur die in einer und derselben Tabelle zusammengestellten Werte miteinander vergleichbar.

Versuch 30A. 10 g frische Hefe bzw. 3,4 g Trockenhefe.

Versuch 30A.  $pH = 5,3$ .

Frische Hefe		Stunden	Getrocknete Hefe	
Zucker red.	g vergorener Zucker		Zucker red.	g vergorener Zucker
4,36	—	0	4,36	—
0,97	3,39	2	2,19	2,17
0,36	4,00	4	0,66	3,70

Versuch 30B.  $pH = 8,5$ .

Die Versuchslösung ist versetzt mit 0,5 ccm 1%iger Phenolphthaleinlösung und 2-n. NaOH bis zur Alkalinität  $pH = 8,3$ . Nach 4 Stunden wurden die Gärungen mit 10 ccm 2-n. NaOH unterbrochen.

Frische Hefe					Stunden	Getrocknete Hefe				
Zucker red.	g vergor. Zucker	ccm 2-n. NaOH	g Alkohol	g $CO_2$		Zucker red.	g vergor. Zucker	ccm 2-n. NaOH	g Alkohol	g $CO_2$
4,36	—	0,5	—	—	0	4,36	—	0,5	—	—
1,39	2,97	3,0	—	—	2	2,91	1,45	4,3	—	—
0,44	3,92	4,5	1,30 33,2%	1,41 36,0%	4	1,68	2,68	5,0	0,95 35,5%	0,99 36,0%

Versuch 31. 6,7 g frische Hefe bzw. 2,2 g Trockenhefe.

Versuch 31A.  $pH = 5,3$ .

Frische Hefe		Stunden	Getrocknete Hefe	
g Zucker red.	g vergorener Zucker		g Zucker red.	g vergorener Zucker
4,02	—	0	4,02	—
1,44	2,58	2	2,64	1,38
0,43	3,59	4	1,50	2,52

Versuch 31B.  $pH = 8,5$ .

Frische Hefe					Stunden	Getrocknete Hefe				
Zucker red. g	verg. Zucker g	ccm 2-n. NaOH	Alkohol g	CO <sub>2</sub> g		Zucker red. g	verg. Zucker g	ccm 2-n. NaOH	Alkohol g	CO <sub>2</sub> g
4,02	—	0,5	—	—	0	4,02	—	0,5	—	—
1,98	2,04	3,3	—	—	2	3,21	0,81	3,0	—	—
0,83	3,19	5,5	1,13	1,16	4	2,41	1,61	3,5	0,55	0,57
= 35,4 % = 36,3 %						= 34,2 % = 35,4 %				

Versuch 32. 3,3 g frische Hefe bzw. 1,1 g Trockenhefe.

Versuch 32A.  $pH = 5,3$ .

Frische Hefe		Stunden	Getrocknete Hefe	
g Zucker red.	g vergorener Zucker		g Zucker red.	g vergorener Zucker
4,31	—	0	4,31	—
2,80	1,51	2	3,57	0,74
2,09	2,22	4	3,01	1,30
1,25	3,06	6	2,43	1,88

Versuch 32B.  $pH = 8,5$ .

Frische Hefe					Stunden	Getrocknete Hefe				
Zucker red. g	verg. Zucker g	ccm 2-n. NaOH	Alkohol g	CO <sub>2</sub> g		Zucker red. g	verg. Zucker g	ccm 2-n. NaOH	Alkohol g	CO <sub>2</sub> g
5,98	—	0,5	—	—	0	5,98	—	—	—	—
4,67	1,31	3,8	—	—	2	5,47	0,51	0,7	—	—
3,83	2,15	4,0	—	—	4	5,13	0,85	0,9	—	—
3,14	2,84	3,5	0,95	—	6	4,80	1,18	0,7	0,37	0,38
= 33,5 %						= 31,4 % = 32,2 %				

Es ergibt sich aus den Versuchen dieses Kapitels zunächst, daß bei der Alkalinität  $pH = 8,5$  die Gärkraft einer

Trockenhefe, wie wir sie untersucht haben, mehr geschwächt erscheint, als bei optimaler Acidität. So ist das Verhältnis:

$$\frac{\text{durch Trockenhefe in 2 Std. vergorener Zucker}}{\text{durch frische Hefe in 2 Std. vergorener Zucker}}$$

bei gleicher Hefemenge für:

$$\begin{array}{l} \text{pH} = 5,3 \\ 0,59 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{pH} = 8,5 \\ 0,43 \end{array}$$

Ferner zeigt sich, daß die prozentische Ausbeute an Alkohol und Kohlensäure im Verhältnis zum vergorenen Zucker bei der Vergärung durch frische und getrocknete Hefe wenig verschieden ist.

Die auf Trockenhefe bezügliche Untersuchung ist hier aus äußeren Gründen unterbrochen worden. Sie wird noch ergänzt werden durch Versuche mit Präparaten, welche praktisch vollständig aus getöteten, nicht fortpflanzungsfähigen Zellen bestehen, um die Alkaliempfindlichkeit des freien Zymasekomplexes in der Hefe mit der Alkaliempfindlichkeit des Hefepreßsaftes zu vergleichen.

### E. Zuwachs von Hefen in alkalischer Lösung.

Durch die in den vorhergehenden Kapiteln angegebenen Messungen ist die Gärungsgeschwindigkeit einer Hefe zum erstenmal bei exakt gemessener und konstant gehaltener Alkalinität festgestellt und mit der Gärungsgeschwindigkeit bei optimaler Acidität verglichen worden.

Auch hinsichtlich des Wachstums in schwach alkalischen Lösungen lagen bis jetzt nur orientierende Bestimmungen, aber keine den gegenwärtigen Anforderungen an Aciditätsangaben entsprechenden Messungen vor.

Nach übereinstimmenden Angaben der Literatur<sup>1)</sup> wirkt freies Alkali auf Hefen schädlich; wo quantitative Angaben vorlagen, sind die Alkalimengen angegeben, welche der Kul-

<sup>1)</sup> Hägglund, Hefe und Gärung in ihrer Abhängigkeit von Wasserstoff- und Hydroxylionen. Akad. Abhandlung Stockholm 1914. — Samml. chem. u. chem.-techn. Vorträge. Enke. Stuttgart 1914.

turflüssigkeit zugefügt worden sind<sup>1)</sup>. Hägglund hat dann insofern einen Schritt weiter getan, als er versucht hat, Gärung und Wachstum als Funktionen der H- und OH-Ionen darzustellen. Indessen kamen die von ihm in Aussicht genommenen elektrometrischen oder kolorimetrischen  $p_{\text{H}}$ -Bestimmungen einstweilen nicht zur Ausführung und das ihm vorliegende Material konnte deshalb zu einer endgültigen Klärung der Verhältnisse nicht führen.

Mit den hier mitzuteilenden Messungen haben wir diese Lücke auszufüllen begonnen und hoffen, daß unser Zahlenmaterial in einiger Zeit im hiesigen Laboratorium erheblich vergrößert werden kann.

Auch zu der von uns angestrebten möglichst allseitigen Beschreibung lebender Zellen dürfte ihre Alkalitoleranz einen nicht unwesentlichen Beitrag liefern.

### Versuchsmethodik.

Die Versuchskolben wurden im Thermostaten bei 30° gehalten. Die Zählung der Hefenzellen geschah im Thomazeißen Objektnetzmikrometer. Bei jeder Entnahme einer Probe wurde der  $p_{\text{H}}$ -Wert von neuem elektrometrisch bestimmt.

#### 1. Versuche mit einer Froberg-Unterhefe (Frohb.-B.).

Die Versuche wurden zunächst mit einer Reinkultur einer Unterhefe vom Froberg-Typus ausgeführt. Den Stamm derselben verdanken wir Herrn Prof. Chr. Barthel.

#### Versuch 1.

#### Versuchslösungen:

50 ccm	10%ige $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung,
25 „	Hefebouillon, 1% Rohrucker enthaltend,
25 „	Leitungswasser,
<hr/>	
100 ccm	Nährlösung.

<sup>1)</sup> In der älteren Literatur findet man besonders eingehende Angaben über Lebensdauer und Gärkraft von Hefen in alkalischer Lösung bei Henneberg. Wochenschr. f. Brauerei, 1908.

Diese Nährlösungen (je 2 Parallelversuche A und B) wurden durch Zusatz folgender Mengen 2-n. NaOH auf die angegebenen elektrometrisch bestimmten  $p_{\text{H}}$ -Werte gebracht:

Nr.	1	2	3	4	5
ccm NaOH	0	0,1	0,2	0,25	0,3
$p_{\text{H}}$	8,3	8,7	9,0	9,4	9,4

Die bei  $110^{\circ}$  sterilisierten Kolben wurden nach dem Abkühlen mit einer Platina-Öse einer stark wachsenden Kultur der Froberg-Hefe geimpft und bei Zimmertemperatur gehalten.

Nach 2 Wochen war in keiner der 5 Lösungen Zuwachs eingetreten.

#### Versuch 2.

Der obige Versuch wurde nach der sauren Seite hin mit Messungen an 4 Lösungen ergänzt, welche den gleichen Phosphatgehalt wie die obigen besaßen und auf folgende elektrometrisch bestimmten  $p_{\text{H}}$ -Werte gebracht worden waren:

$p_{\text{H}}$ =	6,8	7,0	7,7	8,1
------------------	-----	-----	-----	-----

Die sterilen Kolben wurden wie in Versuch 1 geimpft. Nach 10 Tagen zeigte sich in keinem der Kolben ein Zuwachs.

Offenbar hatte hier der starke Gehalt (5%) an Natriumphosphat die Vermehrung der Hefe gehindert. Beim nächsten Versuch wurden deshalb die Nährlösungen ohne Phosphat bereitet.

#### Versuch 3.

In jedem Kolben: 250 ccm Hefebouillon, 4 g Rohrzucker enthaltend. Zusatz von 2-norm. Natronlauge und  $p_{\text{H}}$ -Werte sind wie oben angegeben:

Nr.	1	2	3	4
ccm 2-n. NaOH	0	1	1,5	2
$p_{\text{H}}$	5,9	7,1	7,4	8,3

Die Versuchskolben wurden wie oben angegeben sterilisiert, abgekühlt und geimpft.

Kolben:	1	2	3	4
Nach 4 Tagen { Zellenzahl per mm <sup>3</sup> }	3 000	1 300	160	0
PH	—	7,0	7,4	8,3
Nach 5 Tagen { Zellenzahl per mm <sup>3</sup> }	50 000	52 000	59 000	0
PH	—	—	(7,0)	8,3

Der Zuwachs in 4 Tagen war mit ansteigender Alkalinität fortschreitend gehemmt. Maximum nach diesem Versuch zwischen  $p_H = 7,4$  und  $8,3$ .

## Versuch 4.

Die im vorigen Versuch enthaltenen ziemlich weiten Grenzen für das Maximum der Alkalinität beim Zuwachs mußten weiter eingeschränkt werden.

Jeder Kolben enthielt 175 ccm Hefebouillon mit 4 g Rohrzucker.

Wir geben Alkalizusatz und  $p_H$ -Werte wie früher an:

Kolben	1	2	3	4	5
ccm 2-n. NaOH	0	0,25	0,5	0,75	1,0
PH	6,0	6,55	7,10	7,70	8,4

Die sterilisierten und geimpften Kolben <sup>1)</sup> wurden nach 4, 5 und 7 Tagen auf Zellenzahl per mm<sup>3</sup> untersucht. Es ergab sich:

Kolben	1	2	3	4	5
Nach 4 Tagen	5 200	4 600	—	130	0
„ 5 „	—	—	—	1 900	—
„ 7 „	—	30 000	30 000	35 000	0

Danach wären nun für das Maximum bei dem von uns untersuchten Stamm die Grenzen  $7,7$  bis  $8,3$  zu setzen.

Bei den in den alkalischen Lösungen gewachsenen Zellen konnte keine längere oder unregelmäßigere Form der

<sup>1)</sup> Die Zahl der eingeimpften Zellen war von der Größenordnung 50000 per Kolben, also etwa 1 Zelle per mm<sup>3</sup>.

Zellen gefunden werden, wie dies sonst vielfach beim Wachstum unter ungünstigen Verhältnissen (hoher Säuregrad, sonstige Giftwirkung) beobachtet wurde.

Die folgende Versuchsreihe führte zu einer weiteren Einschränkung dieser Grenzwerte.

Versuch 5.

In 4 Erlenmeyer-Kolben je 175 ccm Hefebouillon mit 1% Rohrzucker.

Zugesetzt wurde in

Kolben	1	2	3	4
ccm 2-n. NaOH	0,7	0,8	0,9	1,0
PH	7,4	7,7	8,0	8,1

Die Zellenzählung nach 3, 4, 5 und 6 Tagen ergab folgende Anzahl per mm<sup>3</sup>:

Kolben	1	2	3	4
Nach 3 Tagen	35	0	—	—
„ 4 „	710	—	—	—
„ 5 „	18 000	370	0	0
„ 6 „	58 000	40 000	0	0

Nach diesen Versuchen geben wir als Alkalitätsmaximum für das Wachstum der Froberg-Hefe die Grenzwerte:

$$pH = 7,7 \text{ bis } 8,0$$

an.

Da dies die ersten Bestimmungen dieser Art sind und wir noch nicht wissen, wie stark die Unterschiede bei verschiedenen Hefen sind, so wollen wir besonders betonen, daß die gefundenen Grenzen zunächst nur für den von uns untersuchten Stamm Gültigkeit haben.

Ferner ist darauf hinzuweisen, daß die angegebene Alkalitätsgrenze für den Fall gilt, daß die Zellen sich nach einer Impfung von der Größenordnung etwa 1 Zelle per mm<sup>3</sup> in der alkalischen Lösung entwickeln.

Führt man hingegen bedeutend größere Hefemengen in Nährlösungen von verschiedenen Alkalitätsgraden ein und

bestimmt man statt der Zellenvermehrung die Gewichtszunahme der Hefe, so kommt man, wie zu erwarten, zu anderen Maximalwerten für  $p_{\text{H}}$ . Dies zeigen bereits die Versuche von Euler und Hammarsten, welche mit einer Stockholmer Brennereihefe S B a, und zwar mit 5 g frischer Hefe in 200 ccm Lösung angestellt worden waren. Die Lösungen enthielten in 200 ccm:

1 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,8 g Asparagin
0,05 g $\text{MgSO}_4$	6,0 g Rohrzucker.

Die Gewichtsvermehrung der Hefe betrug in 5 Stunden:

	$p_{\text{H}} =$	7—7,4	8,0
Bei Zusatz von 10% Phosphatgemisch	33%	3,1%	
Ohne Phosphatzusatz . . . . .	31%	16,5%	

Die Bestimmung der maximalen Toleranz wurde ausgedehnt auf die Feststellung einer vollständigen

### Empfindlichkeitskurve des Wachstums.

Bezüglich der Versuchsmethodik ist zu erwähnen:

Versuchslösung:

5 g Ammoniumphosphat	} in 1 Liter.
4 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$	
20 g Rohrzucker	

Es wurden folgende Mengen  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bezw. NaOH zugesetzt:

Anfängliche Zellenzahl:  $0,46 \cdot 10^{10}$ .

Zusätze zu 100 ccm Lösung	Ausgangs-	24 stünd.	Mittelwert	Zellenzahl nach 24 St. $10^{10}$
	acidität	Vorbe- handlung		
	$p_{\text{H}}$	$p_{\text{H}}$	$p_{\text{H}}$	
a. 2,4 ccm 2-n. $\text{H}_2\text{SO}_4$	2,1	2,12	2,1	0,46
b. 0,9 „ „	3,0	2,86	2,9	0,48
c. 0,7 „ „	4,35	3,2	3,8	0,55
d. 0,5 „ „	5,3	4,3	4,8	0,62
e. — „ „	6,0	5,6	5,8	0,58
f. 2,0 „ 2-n. NaOH	7,3	6,8	6,0	0,46
g. 2,85 „ 2-n. NaOH	8,5	6,7	7,6	0,46

Der Lösung f wurde während der Vorbehandlung noch 1,5 ccm 2-n. NaOH, der Lösung g noch 1,75 ccm 2-n. NaOH zugesetzt.

Die kleine Reaktionsänderung der Lösung während der Vorbehandlung ist durch die große Pufferwirkung der Phosphate in diesem  $p_H$ -Gebiet erklärt.

Nach Svanberg<sup>1)</sup> beträgt die Aciditätszahl der gehopften Würze 5,1. Dieser Wert fällt recht genau mit der hier gefundenen optimalen Acidität unserer an diese Reaktion gewöhnten Hefe zusammen. Wir haben hier einen der Fälle, daß die normalen Lebensbedingungen zu den optimalen Verhältnissen geworden sind.

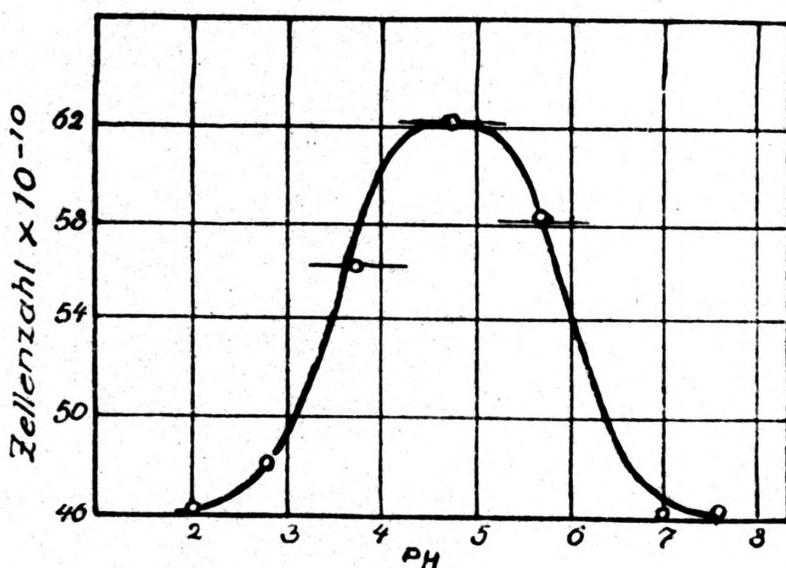


Fig. 3.

## 2. Versuche mit der Brennerei-Oberhefe SB II.

Es wurden in zehn Erlenmeyer-Kolben vermischt:

- 50 ccm 10%ige NaPhosphatlösung als Puffer,
- 25 „ Hefebouillon, enthaltend 0,5 g Rohrzucker,
- 25 „ Leitungswasser.

Die Nährlösungen wurden durch Zusatz folgender Mengen 2-n. NaOH auf die angegebenen  $p_H$ -Werte gebracht, welche elektrometrisch ermittelt wurden. Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus 2 Versuchen:

Nr.	1	2	3	4	5
ccm 2-n. NaOH	1	1,5	1,75	2	2,5
$p_H$	7,80	8,50	9,40	9,75	10,15

<sup>1)</sup> Svanberg, Akad. Abh. S. 30 (Stockholm, 1918).

Die Lösungen 1—4 waren somit deutlich alkalisch, die Lösungen 1 reagierten auf Phenolphthalein mit ganz schwacher Rosafärbung.

2,5 g frischer Preßhefe wurden in 250 ccm Leitungswasser aufgeschlemmt und mit 0,3 ccm 2-n. Natronlauge  $\frac{1}{2}$  Stunde gegen Phenolphthalein alkalisch gehalten. Zu jedem Versuchskolben wurden 10 ccm dieser Hefenaufschlemmung gegeben, also 0,1 g Hefe per 110 ccm.

Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Nr.	Zellenzahl		pH		Zuwachs bis $\frac{\circ}{\circ}$
	Beginn	nach 13 Std.	Beginn	nach 13 Std.	
1	86	113	7,8	7,11	31,5
2	78	99	8,5	7,29	27
3	73	67	9,4	8,45	) Kein Zu- wachs
4	89	86	9,75	9,02	
5	80	73	10,15	9,90	

Eine Vermehrung der Hefezellen hatte also mit Sicherheit noch bei  $p_H = 7,3$  stattgefunden.

Milchsäurebakterien, speziell Laktobazillen, welche in der angewandten Brennerei-Preßhefe vereinzelt vorkamen, aber auch Streptokokken hatten sich in den Versuchen Nr. 5 sehr stark vermehrt, so daß sie in diesen Proben geradezu vorherrschend vorkamen.

Impft man alkalische Lösungen mit Brennerei-Preßhefe, welche ja in der Regel Milchsäurebakterien enthält, so entwickeln sich diese sehr stark unter Zurückdrängung der Hefe, und zwar fand der eine von uns (Svanberg)<sup>1)</sup> einen Stamm von auffallend großer Alkalitoleranz.

Führt man dagegen in die Nährlösung von vornherein eine größere Menge Preßhefe ein, so kommen die Milchsäurebakterien in dieser großen Hefeaussaat nicht zur Ent-

<sup>1)</sup> Svanberg, loc. cit.

wicklung; dies zeigt der folgende Versuch, welchen wir in Rücksicht auf unsere Arbeiten über alkalische Gärung angestellt haben:

## Versuch 6.

## Nährlösung:

40	ccm 24%ige Invertzuckerlösung, steril
100	ccm 10%ige $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung
60	ccm Leitungswasser
0,5	ccm 1%ige alkoholische Phenolphthaleinlösung
<hr/>	
200,5	ccm.

In diese 200 ccm Lösung wurden 10 g frische Preßhefe eingetragen. Die Flüssigkeit wurde dann mit 5 ccm 2-n. NaOH alkalisch gemacht, und zwar bis zur Alkalinität  $p_{\text{H}} = 8$  bis 8,5.

Vergärungstemperatur war  $30^\circ$ .

In der Lösung trat bald eine starke Säuerung ein, welche von Zeit zu Zeit durch Alkalizusätze neutralisiert wurde. Es wurde an 2-norm. Alkali verbraucht:

Stunden	Zugesetztes Alkali	Zucker %
0	5	4,8
1	+ 8	—
2	+ 5	2,2
3	+ 5	—
4	+ 4	1,2
5	+ 6	—
9	+ 2	—
24	+ 1,5	—
27	0	—

Die Vermehrung der Bakterienzellen wurde mikroskopisch verfolgt. Nach 24 Stunden hatte sich der Quotient

$\frac{\text{Anzahl Hefezellen}}{\text{Anzahl Bakterienzellen}}$  nicht merkbar geändert.

## Neue Versuche.

Wir haben zur Kontrolle mit unserer Hefe SB II ähnliche Versuche wie Euler und Hammarsten (siehe S. 229) angestellt. Dieselben sind von Frl. G. Hallberg ausgeführt worden.

Die Lösung wurde folgendermaßen hergestellt:

- 75 ccm Natriumphosphatlösung, 10%ig
- 75 ccm Wasser
- 5 g Rohrzucker
- 0,5 ccm Phenolphthaleinlösung, 1%ig
- 10 frische Hefe.

#### Versuch 7.

$p_H = 8,4$  ( $30^\circ$ ) (ohne Stickstoffnahrung).

Unmittelbar nach der Mischung wurde in einem Teil der homogenen Emulsion die Hefetrockensubstanz bestimmt.

Stunden	0	1	2	3	4
Anzahl zugesetzte ccm 2-n. NaOH	0,5	3,2	9,2	13,2	14,7

Die Lösung wurde unmittelbar nach der Gärung auf etwa  $10^\circ$  abgekühlt und blieb über Nacht stehen. Nach 20 Stunden enthielt die Lösung noch 0,2% Zucker.

Das Volumen der Lösung betrug 186 ccm.

50 ccm entsprechen einer zugesetzten Hefenmenge von 0,820 g (Trockensubstanz). 950 ccm wurden nach dem Versuch zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit Wasser versetzt und zur Reinigung wieder zentrifugiert. Das Trockengewicht<sup>1)</sup> dieses Zentrifugats betrug 0,915 g.

Der Zuwachs an Hefe betrug also 11,5%.

#### Versuch 8.

$p_H = 7,2$  ( $30^\circ$ ) (ohne Stickstoffnahrung).

Dauer der Gärung 3 Stunden. Volumen der Lösung 200 ccm.

50 ccm entsprachen einer zugesetzten Hefenmenge von 0,76 g (Trockensubstanz).

<sup>1)</sup> Folgender Versuch zur Trockengewichtsbestimmung wurde angestellt: 1 g Hefe wurde mit 50 ccm destillierten Wassers verrührt. Die Emulsion wurde zentrifugiert, das Wasser abdekantiert. Die zurückgebliebene Hefe wurde nun quantitativ mit Wasser in eine gewogene Schale übergeführt, der Inhalt zur Trockne eingedunstet und zur Konstanz gewogen. Resultat: 0,3054 g.

50 ccm wie beim Versuch 7 zentrifugiert und behandelt. Trockengewicht des schließlichen Zentrifugates: 1,02 g und 1,06 g.

Der Zuwachs an Hefe betrug hier also 34,2% bzw. 39,5%.

Es bestätigt sich also, daß eine Gewichtsvermehrung der Hefe stattfinden kann, auch wenn keine Aussprossung eintritt.

Daß hierbei die  $p_{\text{H}}$ -Werte stets nach Einführung der Hefe gemessen wurden, ist schon erwähnt worden. Ebenso wurde für eine Torulahefe festgestellt, daß nach 20stündiger Gärung bei natürlicher Acidität ein Aussprossen der Hefe, d. h. eine Zellenvermehrung von rund 15% stattgefunden hat, trotzdem dem Gärmedium keine Stickstoffnahrung zugefügt wurde, während bei alkalisch gehaltener Gärung ( $p_{\text{H}} = 8,2$ ) eine Vermehrung der Hefezellen vollkommen ausblieb.

### Versuche ohne Phosphatzusatz.

Die entsprechenden Ergebnisse in Abwesenheit von Phosphat waren:

$p_{\text{H}} = 8,0$   
16,5%

$p_{\text{H}} = 7$   
30%

Es ergibt sich also, wie aus den Versuchen von Euler und Hammarsten, das Resultat, daß die Alkalitoleranz einer gegebenen Hefemenge verschieden gefunden wird, je nachdem man die Alkalitoleranz auf Zellenvermehrung oder auf Gewichtszunahme bezieht.

### 3. Versuche mit *Saccharomyces ellipsoideus*.

In je 4 Erlenmeyer-Kolben befanden sich 100 ccm Hefebouillon mit 1% Rohrzucker. Phosphat wurde nicht zugesetzt.

Die Nährlösung wurde durch Zusatz folgender Mengen 2-n. Alkalis auf die angegebenen  $p_{\text{H}}$ -Werte gebracht und erneut sterilisiert. Hierauf wurden sämtliche Kolben mit

ca. 5000 Zellen auf Hefebouillon-Rohrzucker einer kräftig wachsenden Kultur von *Sacch. ellipsoideus* geimpft. Die Kolben wurden während des Wachstums der Hefe auf Zimmertemperatur gehalten.

No.		1	2	3	4
ccm 2-n. NaOH		0,4	0,5	0,6	0,7
pH		7,2	7,6	8,0	8,3
Zellenzahl <sup>1)</sup> per mm <sup>3</sup>	Nach 2 Tagen	6 940	73	0	0
	" 3 "	109 000	33 400	29 600	260
	pH n. 3 "	--	—	< 7,0	7,8
	Nach 4 "	138 000	123 000	129 000	71 800

Parallelversuch mit KOH.

Anstelle von NaOH wurde KOH zugesetzt, um eine eventuelle hemmende Wirkung der Na-Ionen auszuschließen.

Die Zusätze und die erreichten I<sub>H</sub>-Werte waren die folgenden:

No.		1	2	3	4
ccm 2-n. KOH		0,4	0,5	0,6	0,7
pH		7,45	7,75	8,2	8,4
Zellenzahl <sup>1)</sup> per mm <sup>3</sup>	Nach 1 Tag	0	—	—	—
	" 2 Tagen	420	20	0	—
	" 3 "	37 600	9 100	0	—
	" 4 "	129 000	124 000	60	0
	pH n. 4 "	< 7	< 7	7,9	8,15

Als obere Alkalitätsgrenze für das Wachstum von *Saccharomyces ellipsoideus* kann also gesetzt werden, gleichgültig ob freies NaOH oder KOH in der Lösung vorhanden ist,

$$pH = 7,9.$$

4. Versuche mit *Pseudosaccharomyces apiculatus*.

Die Versuche wurden genau wie diejenigen der vorhergehenden Reihe ausgeführt. Zugesezte NaOH-Mengen und erreichte p<sub>H</sub>-Werte waren die folgenden:

<sup>1)</sup> 0 bedeutet: < 10 Zellen per mm<sup>3</sup>.

No.	1	2	3	4
ccm 2-n. NaOH	0,4	0,5	0,6	0,7
PH	7,2	7,6	8,0	8,3
Zellenzahl per mm <sup>3</sup> } Nach 10 Tagen	11 000	20	0	0

Als obere Alkalitätsgrenze für den Zuwachs von *Pseudosaccharomyces apiculatus* kann also angegeben werden:

$$pH = 7,6.$$

An dieser Stelle kann ein Vergleich der Zellenzahl per g bei den hier untersuchten Mikroorganismen am Platze sein.

1 g Trockengewicht (getrocknet zur Gewichtskonstanz auf dem Wasserbad) entspricht folgenden Zellenzahlen:

Bei <i>Mycoderma</i> (Heintze) . . . . .	1,12 · 10 <sup>11</sup>
, <i>Mycoderma</i> (Vougt) . . . . .	0,5 · 10 <sup>11</sup>
, <i>Sacch. ellipsoideus</i> . . . . .	0,47 · 10 <sup>11</sup>
, <i>Sacch. cerevisiae</i> Froberg . . . . .	0,21 · 10 <sup>11</sup>

Zum Vergleich seien die übrigen, bis jetzt bekannten, früher hier festgestellten Zellenzahlen angeführt:

<i>Sacch. cerevisiae</i> , Reinkultur H . . . . .	0,16 · 10 <sup>11</sup>
<i>Sacch. cerevisiae</i> , Brennereihefe SB II . . . . .	0,3 · 10 <sup>11</sup>
<i>Torula</i> , untersucht von O. Svanberg <sup>1)</sup> . . . . .	2,5 · 10 <sup>11</sup>

Die untersuchten Zellen variieren, wie aus den obigen Zahlen hervorgeht, nicht stärker als im Verhältnis 1:12.

#### Anhang. Versuche mit *Aspergillus niger*.

Die angewandte *Aspergillus niger*-Kultur verdanken wir Herrn Prof. Ch r. B a r t h e l.

Die Ausführung der Versuche entspricht derjenigen der vorhergehenden. Es wurden 3 Erlenmeyer-Kolben mit je 100 ccm Hefebouillon und 1 g Rohrzucker beschickt.

Zugesetzte Natronlauge und erreichte p<sub>H</sub>-Werte:

	1	2	3
ccm 2-n. NaOH	0,7	0,9	1,0
PH nach wiederholter Sterilisierung	8,4	8,6	8,8

<sup>1)</sup> Svanberg, Fermentforschung, 2 (1918).

Hierauf Impfung jedes Kolbens mit einer Platinöse aus einer sporenbildenden *Aspergillus*-Kultur.

Die Kolben wurden während des Wachstums des Pilzes auf Zimmertemperatur (ca. 18°) gehalten.

### Beobachtungen:

	1	2	3
Nach 3 Tagen	Entwicklung von Hyphen.	Schwache Entwicklung.	Kein sichtbares Wachstum.
„ 4 „	Entwicklung von Hyphen. Keine Sporenbildung.	Entwicklung von Hyphen. Keine Sporenbildung.	Schwache Entwicklung von Hyphen.
„ 5 „	Entwicklung von Fruktifikationsorganen und Sporen.	—	Entwicklung von Hyphen.
„ 6 „	Reichliche Sporenbildung.	Entwicklung von Fruktifikationsorganen und Sporen.	Entwicklung von Hyphen.
„ 9 „	—	—	Schwache Entwicklung von Sporen.

Als obere Grenze der Alkalitoleranz kann also einstweilen für die hier angegebenen Versuchsbedingungen angegeben werden:

$$pH = 9,0 \text{ oder } 0,00001 \text{ n. Alkali.}$$

Durch Anpassung dürfte bei *Aspergillus niger* die Alkalitoleranz erheblich gesteigert werden können.

### F. Zusammenfassung.

1. Es wurde für die alkalische Gärung bei genau gemessener und konstant gehaltener Alkalinität ( $pH = 8$ ) das Verhältnis von vergorenem Zucker zu entwickelter Kohlensäure und gebildetem Alkohol festgelegt; es ergab sich, daß bei einer Oberhefe und einer *Torula* Alkohol und Kohlensäure in äquivalenten Mengen entstehen, und zwar haben wir für beide Produkte bei zahlreichen Versuchen im Mittel die Werte 30—33% vom vergorenen Zucker gefunden.

2. Glukose und Fruktose sowie Invertzucker werden auch bei  $p_H = 8$  gleich schnell vergoren; dagegen zeigt Mannose eine etwa 30% geringere Gärungsgeschwindigkeit. Galaktose wird auch in schwach alkalischer Lösung nur in sehr geringem Grad angegriffen.

3. Was die Biosen betrifft, so wird der Rohrzucker bei  $p_H = 8$  recht angenähert mit der gleichen Geschwindigkeit vergoren wie Glukose, während Maltose auffallenderweise nicht angegriffen wird.

4. Diese Tatsachen beruhen darauf, daß von den hydrolysierenden Enzymen wohl die Invertase, nicht aber die Maltase bei  $p_H = 8$  wirksam ist, obwohl die optimale Acidität der Maltasewirkung nach dem Befund von Michaelis und Rona näher dem Neutralpunkte liegt als diejenige der Invertase. Die Rohrzuckerinversion wurde durch Zurückdrängen der Gärung mittels Toluolzusatzes bis  $p_H = 8,5$  quantitativ verfolgt.

5. Die Wirkung von Giften auf die Hefegärung ist in alkalischer Lösung vielfach eine wesentlich andere als bei normaler Acidität, besonders wo sich Unterschiede zwischen den Wirkungen der Ionen und der nichtdissociierten Moleküle geltend machen. Es wurden untersucht: Toluol, Chloroform, Acetaldehyd, Milchsäure, Chloressigsäure, Adrenalin, Thyrrheoidea-Extrakt, Anilin, Salicylsäure, Resorcin, Phenol, Pikrinsäure und Natriumthiosulfat.

6. Eine bei Zimmertemperatur aus der Hefe S B II hergestellte Trockenhefe verhielt sich bei  $p_H = 8$  im wesentlichen ebenso wie frische Hefe.

7. Der Zuwachs der Zellenzahl wurde nach unseren Messungen bei folgenden Konzentrationen aufgehoben:

Frohberg-Unterhefe B	bei $p_H = 7.7-8.0$
Brennerei-Oberhefe S B II	„ „ = $\begin{cases} 7.3 \\ 8.4 \end{cases}$
Sacch. ellipsoideus	„ „ = 7.9
Pseudosacch. apiculatus	„ „ = 7.6

Eine Gewichtsvermehrung ließ sich bei unserer Oberhefe S B noch bei der Alkalinität  $p_H = 8,5$  nachweisen.

Für eine Froberg-Unterhefe H wurde die vollständige Kurve der Aciditätsempfindlichkeit aufgestellt und das Optimum bei  $p_H = 5$  gefunden.

An dieser Untersuchung haben als biochemische Mitarbeiter des Laboratoriums teilgenommen: H. Egnér, K. Brandting, G. Hallberg, N. Florell, S. Heintze und E. Moberg, denen wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen wollen.