

# Saccharasegehalt und Saccharasebildung in der Hefe.

Von

H. v. Euler und Olof Svanberg.

Mit 5 Figuren im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. Mai 1919.)

## Inhalt:

I. Frühere Beobachtungen und Arbeiten. — II. Methodik. — III. Definition der Inversionsfähigkeit lebender Zellen. — IV. Konstanz der Inversionsfähigkeit zweier Hefen während 8 bzw. 2 Jahren. — V. Übersicht über die bis jetzt bestimmten Inversionsfähigkeiten. — VI. Einfluß der Temperatur auf die Saccharasebildung. — VII. Abhängigkeit der Saccharasebildung von der Acidität. — VIII. Enzymgehalt in ausgewaschener und nicht ausgewaschener Hefe.

Seit einer Reihe von Jahren sind die Arbeiten des hiesigen Laboratoriums darauf gerichtet, den Enzymgehalt lebender Hefen quantitativ festzulegen. Dieser Aufgabe ist eine reichliche Arbeit zugewandt worden, und zwar in der Erwägung, daß die Kenntnis der Reproduzierbarkeit eines normalen Zustandes oder richtiger eines Ausgangszustandes der Zellen die Voraussetzung ist für ein erfolgreiches Studium der Enzymveränderungen.

Die Enzymbildungen und Enzymveränderungen, Vorgänge, welche noch im Bereich der quantitativen chemischen Forschung liegen, müssen die Grundlage bilden für die Kenntnis derjenigen Erscheinungen, mit welchen die lebende Zelle nach kürzerer oder längerer Zeit auf äußere Einflüsse reagiert.

Schon aus den Jahren 1880—1890 besitzen wir Mitteilungen über die Änderungen des Enzymgehalts, welche an Mikroorganismen bei der Vorbehandlung mit verschiedenen Nährlösungen auftreten. Unter diesen Versuchen ist gewiß

manche sehr bemerkenswerte Beobachtung gemacht und veröffentlicht worden. Sicher ist aber, daß die älteren Beobachtungen feste Ausgangspunkte zu einer Weiterentwicklung dieser Forschungsrichtung nicht geliefert haben. Dieselben gaben nämlich keinen Aufschluß darüber, ob die erreichten Änderungen auch nur einigermaßen reproduzierbar waren, oder ob sie nicht vielmehr im Bereich der Variationen lagen, welche unabhängig von der Zusammensetzung der Nährlösungen entstehen. Noch weniger ließen diese älteren Beobachtungen allgemeine Schlüsse darüber zu, welche Bedingungen eine Änderung des Enzymgehaltes hervorrufen können, und von welchem Umfang und welcher Art die Änderungen sind.

### I. Frühere Beobachtungen und Arbeiten<sup>1)</sup>.

Im Jahre 1882 machte Wortmann<sup>2)</sup> die Beobachtung, „daß den Bakterien die höchst merkwürdige Eigenschaft zukommt, nur dann ein stärkeumbildendes Ferment zu erzeugen, wenn ihnen außer der Stärke keine andere benutzbare Kohlenstoffquelle zu Gebote steht“. In Verfolgung dieser Entdeckung hat dann Wortmann auch die Frage aufgeworfen, ob die Abscheidung von Saccharase aus Hefe in ähnlicher Weise von der Gegenwart von Rohrzucker abhängig ist. „Wir würden also“, schreibt er, „wenn wir Hefe in Traubenzuckerlösung kultivierten, kein invertierendes Ferment auffinden können, sondern nur dann, wenn wir statt des Traubenzuckers Rohrzucker anwenden würden.“

Die Prüfung nahm Wortmann in folgender Weise vor: „Es wurden 50 ccm einer 15%igen Rohrzuckerlösung einerseits und einer ebenso konzentrierten Lösung chemisch reinen Traubenzuckers andererseits in je ein Glaskölbchen gebracht; jeder Lösung so viel Aschenbestandteile zugefügt, daß die Konzentration 5% betrug und hierauf einer jeden so präparierten Flüssigkeit zwei Tropfen einer vorher in Traubenzuckerlösung rein kultivierten Hefe zugesetzt. Die Kölbchen wurden dann gut verkorkt und in den Wärmekasten gebracht. Nach einigen Tagen, wenn in beiden

<sup>1)</sup> Bezüglich der Literatur der hier in Betracht kommenden Grenzgebiete verweisen wir auf die ausgezeichnete Monographie von H. Pringsheim, Die Variabilität niederer Organismen. Berlin 1910.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 6, S. 287 (1882).

Gefäßen die Gärung in vollstem Gang befindlich war, wurde der Inhalt beider Gefäße filtriert und jedes Filtrat mit großen Mengen absoluten Alkohols versetzt. Die hierdurch entstandenen Niederschläge wurden (jeder für sich natürlich) auf einem Filter gesammelt, mit Wasser aufgenommen und zu jeder Lösung gleiche Mengen einer verdünnten Rohrzuckerlösung gefügt. Diese beiden Rohrzuckerlösungen wurden ein bis zwei Tage konstant auf 40° erwärmt. Bei einer darauf vorgenommenen Prüfung mit Barfoedschem Reagens konnte immer in beiden Rohrzuckerlösungen das Vorhandensein von Traubenzucker nachgewiesen werden.“

Dieser Versuch sagt ja in quantitativer Hinsicht nichts, und hinsichtlich des qualitativen Schlusses kann der Einwand gemacht werden, daß nur ein sehr geringer Bruchteil der Hefensaccharase aus der frischen Hefe in Lösung geht, und daß dieser Bruchteil vermutlich gerade von den alten eingimpften Zellen herrührt, somit über die Enzyymbildung keine bindende Auskunft gibt. Immerhin hat Wortmann trotz seines unzureichenden Versuchsmaterials das richtige Ergebnis getroffen, „daß die in Traubenzuckerlösung kultivierte Hefe ebensogut (wenn nicht sogar noch etwas mehr) Invertin abscheidet als die in Rohrzuckerlösung befindliche“. Anreicherung wird nicht erwähnt.

Wortmanns Ergebnis ist in den folgenden Jahren nicht weiter aufgenommen worden, und so verdankt man die erste eingehende Untersuchung auf diesem Gebiet A. Fernbach<sup>2)</sup>, welcher speziell der Saccharase der Hefe viele Versuche gewidmet hat. Seine nahezu 30 Jahre alte Untersuchung gehört zweifellos sowohl der Anlage als der Durchführung nach zu den besten dieser älteren Forschungsperiode, und es erscheint uns angezeigt, zu untersuchen, welche Tatsachen und Schlüsse aus der Fernbachschen Arbeit in den gegenwärtigen Bestand der Forschung übernommen werden können.

Als Thema der Untersuchung nennt Fernbach „la formation de la sucrase“.

Was zunächst die Versuchsmethodik Fernbachs betrifft, so definiert dieser Autor die von ihm vorgeschlagene Wirkungseinheit folgendermaßen: „Einheit der Saccharase ist eine solche Menge Saccharase, welche 0,02 g Zucker in 1 Stunde

<sup>1)</sup> Fernbach, Ann. Inst. Pasteur Bd. 4, S. 641 (1890).

invertiert, und zwar bei einer Temperatur von 54—56° in Gegenwart eines Zusatzes von Essigsäure, welche die Inversion am meisten begünstigt.“ Hiernach geschah die quantitative Bestimmung der Saccharase in der Weise, daß dasjenige Volumen der enzymhaltigen Flüssigkeit aufgesucht wurde, welches die Einheit der Saccharase enthielt, also imstande war, unter den erwähnten Umständen 0.02 g Rohrzucker in 1 Stunde zu invertieren.

Wesentlich für die Beurteilung der Fernbachschen Resultate ist sein Verfahren, die in den Zellen enthaltene bzw. gebildete Saccharase zu bestimmen. Er hat dazu nicht die einfachste und zugleich genaueste Methode gewählt, nämlich die Inversion durch die Hefezellen direkt, sondern er hat das Enzym in folgender Weise quantitativ aus den Zellen herauszuschaffen versucht.

Von der Würze, in welcher die Hefe gewachsen ist, wird der größte Teil, welcher sich ohne Verlust von Hefezellen entfernen läßt, abdekantiert. Man mißt das so entfernte Volumen und kann daraus auch das kleine Volumen der zurückbleibenden Würze berechnen. Zu dieser Hefe wird nun steril eine abgemessene Menge destillierten Wassers zugesetzt, mit welchem die Hefe bei 30—35° einige Tage stehen bleibt. Nach dieser Zeit wird wiederum die über der Hefe stehende klare Flüssigkeit, soweit dies ohne Hefenverlust möglich ist, dekantiert, abgemessen, auf ihren Enzymgehalt geprüft und mit einer ebenso großen Menge sterilen Wassers ersetzt. Diese Operation wiederholt man in geeigneten Zeitabständen so lange, bis sich in der abdekantierten Flüssigkeit keine Saccharase mehr nachweisen läßt. Die Summe der in allen Dekantaten gefundenen Saccharase ergibt nach Fernbach den Saccharasegehalt der Zellen.

Dieses Verfahren ist, wie ersichtlich, sehr umständlich; prinzipiell wäre gegen dasselbe nichts einzuwenden, wenn durch die Autolyse keine Saccharase zerstört wird, und wenn tatsächlich die gesamte Enzymmenge aus dem Hefenrückstand in die Flüssigkeit überginge.

Über den Vorgang bei diesem als Extraktion bezeichneten Verfahren spricht sich Fernbach nicht klar aus. Er besteht zweifellos in einer fortschreitenden Autolyse.

Auch in der Würze, in welcher sich die Hefe entwickelt hat, fand Fernbach stets Saccharase, und zwar bei allen von ihm untersuchten Hefen, nämlich einer Brauereihefe aus

Tantonville, einer pale-ale-Hefe, einer Champagnerhefe und bei Sacch. Pastorianus. Eine solche Ausscheidung von Saccharase aus lebenden Zellen in einigermaßen nennenswertem Grad entspricht nicht den Erfahrungen, welche wir mit den von uns untersuchten Hefen gemacht haben, vielmehr tritt bei den uns bekannten Hefen die Saccharase in erheblichem Grade nur aus den Zellen aus, welche in irgend einer Weise abgetötet sind.

Um eine Vorstellung über die Resultate Fernbachs zu gewinnen, führen wir folgenden Versuch an, welcher sich auf Brauereihefe von Tantonville bezieht.

Volumen der Lösung: 50 ccm. Temperatur: 20°. Gewicht der Hefe nach Trocknung bei 100° bestimmt. Saccharase in der oben definierten Einheit angegeben.

Versuchsdauer Tage	Verbrauchte Maltose	Acidität, ausgedrückt in mg Weinsäure	Gewicht der Hefe	Saccharase in der Flüssigkeit	Saccharase in den Zellen							Totalmenge Saccharase
					I	II	III	IV	V	VI	Summe	
2	0,72	36	0,071	5,5	3,7	3,3	0,5	—	—	—	7,5	13,0
3	1,72	49	0,108	8,6	5,1	9,6	2,4	1,2	0,7	0,5	19,5	28,1
4	2,48	41	0,142	10,0	4,0	8,0	13,7	2,3	0,9	0,4	29,3	39,3
5	3,12	50	0,135	11,5	4,0	13,5	12,8	1,8	—	—	32,1	43,6
6	3,12	35	0,135	13,9	3,7	9,1	13,1	2,1	1,0	—	29,0	42,9

Nach unseren Erfahrungen ist bei einer solchen Versuchsmethodik die vollständige Extraktion der Saccharase nicht gewährleistet. Jedenfalls hat Fernbach unterlassen zu zeigen, daß der schließliche feste Rückstand nach Extraktion VI frei von Saccharase war. Selbst haben wir auch bei 14 tägiger Autolyse nie einen annähernd saccharasefreien Rückstand erhalten.

Bei einem zwecks Darstellung von Saccharase ausgeführten Versuch wurden 7 kg 30%ige Hefe unter Toluolzusatz 4 Tage autolysiert und ohne Zusatz von Wasser filtriert, wobei 1200 ccm Saft gewonnen wurden.

1 g der ursprünglichen Hefe gab die Inversionskonstante

$$k \cdot 10^4 = 235;$$

1 ccm Saft gab

$$k \cdot 10^4 = 37;$$

1 g breiiger Rückstand gab

$$k \cdot 10^4 = 251.$$

Berechnet man hieraus für 7 g Hefe den Wert 1645  
 für 6 g Rückstand 1506 } = 1543  
 und für 1 ccm Saft 37

so sieht man, daß bei der Autolyse nur ein geringer Verlust (6.6 %) an wirksamer Saccharase (durch Inaktivierung) entstanden ist.

Eine Prüfung genau nach der Fernbachschen Arbeitsmethode ist mit einer Hefe, welche nicht die von ihm speziell für Hefe von Tantonville betonte Eigenschaft hat, sich gut abzusetzen, schwer ohne Verluste durchführbar. Immerhin zeigt folgender Versuch, daß bei Zimmertemperatur in der von Fernbach angewandten Versuchszeit durch Autolyse eine Verteilung des Enzyms zwischen Hefe und Saft eintritt, nach welcher etwa 10 % der Saccharase aus der Hefe in die Lösung geht. Natürlich wird diese Ausbeute bei höherer Temperatur und bei mehrfachem Wechsel von Wasser wesentlich erhöht, aber auch bei 30° kann Hefe bei Fernbachs Versuchen nicht vollständig autolysiert gewesen sein, um so weniger, als Fernbach bemerkt, daß sich die Hefe gut abgesetzt hat.

Saccharase-Ausscheidung bei der Autolyse der Hefe.

1. Brauerei-Unterhefe.

Mit 0,60 g unvorbehandelter Hefe H wurden 60 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung bei optimalem pH und bei 17° invertiert:

Minuten	Drehung im 5-cm-Rohr	k. 10 <sup>4</sup>
0	1,33	—
20	0,83	71
30	0,61	74
40	0,40	79
50	0,28	76
		<u>Mittel 75</u>

Hieraus berechnet sich für

$$1 \text{ g Hefe: } k \cdot 10^4 = 125.$$

Je 1 g Hefe wurde in 5 Erlenmeyer-Kolben eingewogen, mit 25 ccm destillierten Wassers aufgeschlemmt und mit 1 ccm Toluol versetzt.

Die Kolben wurden täglich mehrmals geschüttelt; täglich wurde ein Kolbeninhalt bis zur vollständigen Klarheit filtriert. Mit den Filtraten wurden die folgenden Inversionsversuche (60 ccm 8%ige Rohrzuckerlösung, 0,5% PO<sub>4</sub>) bei Zimmertemperatur angestellt.

Dauer der Autolyse	Minuten	Drehung im 5-cm-Rohr	k. 10 <sup>4</sup>	k. 10 <sup>4</sup> Mittel
1 Tag (24 St.)	0	1,33	—	
	30	1,33	0	
	60	1,32	0,4	0,5
2 Tage	37	1,21	8,1	
	71	1,10	8,4	
	139	0,93	7,9	8,1
3 Tage	41	1,16	10,5	
	110	0,94	9,7	10,1
4 Tage	45	1,15	10,2	
	75	1,03	10,5	
	100	0,92	11,2	10,7; korr. 12,4 wegen 4 ccm
5 Tage	45	1,09	13,8	
	75	0,98	12,5	
	100	0,87	12,8	13,0

Wir geben folgende Zusammenstellung obiger Konstanten:

Total	Saccharase	
	in Lösung	nach Tagen
125	8,1	2
	2,0	3
	2,3	4
	0,6	5
	13,0 = 10,4% der Gesamtmenge	

## 2. Brennerei-Oberhefe S B.

0,69 g unvorbehandelte Hefe S B invertierte 60 ccm einer 8%igen Rohrzuckerlösung mit 0,5% PO<sub>4</sub>-Zusatz bei Zimmertemperatur.

Minuten	Drehung im 5-cm-Rohr	k. 10 <sup>4</sup>	k. 10 <sup>4</sup> Mittel
0	1,33	—	
32	0,75	53	
40	0,58	59	
50	0,44	59	
60	0,32	59	58

Dies entspricht für 1 g Hefe:  $k \cdot 10^4 = 84$ .

Je 1 g Hefe in 5 Erlenmeyer-Kolben wird wie im vorhergehenden Versuch behandelt.

Dauer der Autolyse	Minuten	Drehung im 5-cm-Rohr	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$ Mittel
—	0	1,33	—	
1 Tag	30	1,30	2,4	
	180	1,16	2,4	2,4
2 Tage	37	1,26	4,9	
	71	1,18	5,3	
	139	1,09	4,5	4,8
3 Tage	45	1,22	6,1	
	75	1,15	6,1	
	100	1,08	6,5	6,2
4 Tage	45	1,20	7,2	
	75	1,14	6,5	
	100	1,07	6,8	6,8

Zusammenstellung:

Total	Saccharase	
	in Lösung	nach Tagen
84	2,4	1
	2,4	2
	1,4	4
	0,6	5
	<hr/>	
	6,8 = 8,1% der Gesamtmenge.	

Daß Fernbach durch seine Methodik zu kleine Werte für den Saccharasegehalt der Hefezellen gefunden hat, geht auch aus folgender Berechnung hervor:

Nach Fernbach invertiert die Saccharase-Einheit in einer Stunde 0,2 g Rohrzucker bei 54—56° und optimaler Acidität.

Wie S. 215 dargelegt, bestimmen wir den Saccharasegehalt bzw. die invertierende Fähigkeit der Hefe durch den Quotienten

$$\frac{\text{Inversionskonstante } k \times \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}}$$

wobei die Grenzen der Zuckermengen festgelegt sind.

Rechnen wir die Fernbachsche Einheit in Reaktionskonstanten um, so ergibt sich:

Minuten	bei 16 g Zucker		bei 8 g Zucker		bei 2 g Zucker <sup>1)</sup>	
	Rohrzucker	k. 10 <sup>4</sup>	Rohrzucker	k. 10 <sup>4</sup>	Rohrzucker	k. 10 <sup>4</sup>
0	16	—	8	—	2	—
60	15,8	0,91	7,8	1,83	1,8	7,7

Hieraus ergibt sich für k. g Zucker bei 56°:

$$\frac{16 \times 0,91 \cdot 10^{-4}}{14,5 \cdot 10^{-4}}$$

$$\frac{8 \times 1,83 \cdot 10^{-4}}{14,5 \cdot 10^{-4}}$$

$$\frac{2 \times 7,7 \cdot 10^{-4}}{15,4 \cdot 10^{-4}}$$

Aus der Fernbachschen Versuchsserie I, Ann. Inst. Past. 4, S. 656 entnehmen wir:

0,071 g Hefe (poids de levure; darunter ist nach S. 655, Zeile 4 v. u. das Trockengewicht verstanden), geben 13 Saccharase-Einheiten.

Somit

$$\frac{k \times \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}} = \frac{13 \times 15,4 \cdot 10^{-4}}{0,71 \cdot [0,16 \text{ bis } 0,30] \cdot 10^{11}} = 9 \text{ bis } 18 \cdot 10^{-12} \text{ bei } 56^{\circ}$$

woraus sich für 16° ergibt:

$$1 \text{ bis } 2 \cdot 10^{-12}.$$

Das Gesagte mag hinreichen, um zu zeigen, daß das Zahlenmaterial der Fernbachschen Arbeit unter der erheblichen Unsicherheit der Methodik leidet.

Betrachten wir dann die quantitativen Ergebnisse, so sehen wir, daß Fernbach nach seinen eigenen Ziffern tatsächlich nur recht geringe Saccharasebildungen erzielt hat. Aus der oben (S. 205) wiedergegebenen Tabelle, die sich auf die Hefe von Tantonville bezieht, entnehmen wir:

<sup>1)</sup> Vergl. Fernbach, Ann. Inst. Pasteur Bd. 4, S. 4 (1890).

I. Tage der Vorbehandlung	II. Hefengewicht	III. - Gesamtmenge der Saccharase	III/II. Saccharase per Hefengewicht	
Ausgangszustand			nicht bestimmt	
2	0,071	13,0	183	1,0
3	0,108	28,1	260	1,4
4	0,142	39,3	277	1,5
5	0,135	43,6	323	1,8
6	0,135	42,9	318	1,7

Die größte erzielte Enzymvermehrung trat also nach 5 Tagen ein und betrug 1 : 1,8.

Die übrigen Tabellen weisen noch weniger günstige Resultate auf. Der Versuch, welcher sich auf pale-ale-Hefe bezieht (S. 660), zeigt kaum eine Steigerung, der Versuch mit *Saccharomyces Pastorianus* (S. 662) führte zu einem Abfall des Wertes: Saccharase per Hefengewicht.

Wenden wir uns zur Tabelle S. 669, welche den besonders guten Einfluß des Hefenwassers auf die Saccharasebildung zeigen soll, so ergibt sich folgendes:

Tage der Vorbehandlung	Gesamt-Saccharase per Hefengewicht	
0	nicht bestimmt	
1	281	1,00
3	243	0,87
5	267	0,95
7	443	1,58

Nach dem S. 203—210 Gesagten dürfte es nicht erforderlich sein, auf die Verwertungsmöglichkeiten des Zahlenmaterials von Fernbach weiter einzugehen.

Trotzdem soll hervorgehoben werden, daß Wortmann und Fernbach sich als die Ersten in ein Gebiet gewagt haben, dessen Bearbeitung bei dem damaligen Stand der Enzymologie und der chemischen Dynamik große Schwierigkeiten bot, und daß es ihnen gelungen ist, mit ihren unzu-

reichenden Mitteln zu Schlüssen zu gelangen, welche später exakt bestätigt werden konnten und die volle Aufmerksamkeit verdienen.

Unter den systematischen Arbeiten über Enzyymbildung ist ferner diejenige von F. A. F. C. Went<sup>1)</sup> über den Einfluß der Nahrung auf die Enzyymbildung durch *Monilia Sitophila* zu erwähnen. Went hat in dieser Arbeit 11 verschiedene Enzyme untersucht, am genauesten die Maltase. Zur Charakterisierung seiner Arbeitsweise und seiner Ergebnisse führen wir ausführlich die hinsichtlich eines Enzyms ausgeführten Versuche an, und wählen hierzu die Invertase.

„Saccharose wird“, schreibt Went, „von *Monilia sitophila* invertiert. Wenn man den Pilz in einer Saccharoselösung zieht, kann man bald in der Lösung die Anwesenheit von Invertzucker in großen Mengen anzeigen mit Hilfe des Polarimeters oder der Fehlingschen Lösung. Solche Flüssigkeiten geben dann mit essigsauerm Phenylhydrazin große Mengen des Glukosazons. Daß hierbei die Kulturflüssigkeit ein Enzym enthält, welches den Rohrzucker invertiert, also Invertase, läßt sich leicht zeigen.“

„Eine 5%ige Saccharoselösung (mit 0,5%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) wurde in zwei Teile geteilt von je 100 ccm, beide sterilisiert, die eine Flüssigkeit mit *Monilia* geimpft und nach 13 Tagen die Kulturflüssigkeit abfiltriert. Dieselbe zeigte eine Linksdrehung von  $2,50^\circ$ , während 1,10 ccm nötig waren zur Reduktion von 10 ccm Fehlingscher Lösung. Die andere Flüssigkeit reduzierte diese Lösung nicht und zeigte eine Rechtsrotation von  $6,80^\circ$ ; es war also fast aller Zucker invertiert worden. Jetzt wurde die Kulturflüssigkeit in zwei Hälften geteilt, die eine (a) blieb unverändert, die andere (b) wurde kurz aufgeköcht. Jede Hälfte wurde mit der gleichen Menge Saccharoselösung gemischt, polarisiert und titriert, darauf mit Toluol versetzt und die Messungen nach 48 und 90 Stunden wiederholt. Das Resultat findet sich in untenstehender Tafel:

	Polarisation			10 ccm Fehl. wurden red. von		
	anfänglich	nach 48 St.	nach 96 St.	anfänglich	nach 48 St.	nach 96 St.
a (nicht gekocht)	+2,20	+1,98	+1,60	2,30	2,10	1,98
b (gekocht)	+1,98	+1,95	+2,02	2,25	2,24	2,26

<sup>1)</sup> F. A. F. C. Went, Jahrb. wiss. Bot. Bd. 36, S. 611 (1901)

Das heißt also, daß die gekochte Flüssigkeit unverändert blieb, während in dem anderen Fall Saccharose invertiert wurde. Es war also Invertase vorhanden. Es fragte sich jetzt, ob diese Invertase auch abgeschieden wird, wenn andere Nährstoffe gegeben wurden, als Saccharose. Dafür wurden einige Versuche angestellt, deren Resultat man in der untenstehenden Tabelle findet. Spalte I gibt die Zusammensetzung der Nährlösung (dieselbe enthielt außerdem 0,5%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), worin der Pilz gezogen wurde während der Anzahl Tage, die in Spalte II angegeben. Darauf wurde abfiltriert, mit einer Saccharoselösung gemischt, polarisiert und nach einer in Spalte III angegebenen Anzahl Stunden wieder polarisiert; die Differenz der beiden Zahlen findet man in Spalte 4 angegeben. Es wurde übrigens auch in jedem Falle konstatiert, daß das Kupferreduktionsvermögen stark zugenommen hatte.“

I. Gehalt an C-Nahrung	II. Alter d. Kultur	III. Versuchszeit	IV. Rotationsänderung
2,5% Raffinose	13 Tage	96 St	— 0,10
1 % Kaliumacetat	45 „	120 „	— 0,55
5 % Natriumlactat	48 „	72 „	— 0,34
5 % Natriummalat	48 „	72 „	— 0,43
5 % Pepton	13 „	48 „	— 0,43
5 % Glycerin	48 „	72 „	— 0,75
5 % Glycerin	43 „	96 „	— 1,48
5 % Glukose	48 „	72 „	— 3,83

„Wie man sieht, ist also in all diesen Fällen Invertase vom Pilze produziert worden; wenn zwar die Zahlen uns nicht genau über die Enzymmengen belehren können, so scheint doch wohl die größte Menge in der Glukosenährlösung entstanden zu sein, während bei Raffinose als C-Quelle kaum merkliche Quantitäten Invertase gebildet worden sind.“

Auch in dieser Arbeit vermischen wir also vor allem die Festlegung des Enzymgehaltes bei einem definierten Normalzustand, welcher gestatten würde, die Enzyymbildung, also den Zuwachs der Enzymwirkung, zu bestimmen. Wir erfahren nicht, durch welche Zellenmengen (Zellenzahlen oder Gewichte) die in der Tabelle angegebenen Rotationsänderungen hervorgebracht worden sind, so daß die verhältnismäßig starke Wirkung der Glukose nicht von einem vermehrten Enzymgehalt der Zellen herzurühren braucht, sondern seinen Grund darin haben kann, daß die Hefe sich in der glukosehaltigen Lösung schneller vermehrt hat.

Ferner kann die „abgeschiedene“, in der Kulturflüssigkeit vorhandene Saccharase nicht als Maß für die in den Zellen gebildete Saccharase angenommen werden.

Zusammenfassend muß also gesagt werden, daß die Arbeit wohl Beobachtungen enthält, welche zu weiteren Versuchen anregen, dagegen keine Messungen, aus welchen endgültige Schlüsse gezogen werden könnten.

Systematische Arbeiten über Saccharasebildung liegen weiter bis zum Beginn der Untersuchungen aus unserem Laboratorium<sup>1)</sup> (1910) nicht mehr vor. In neuerer Zeit haben sich Meisenheimer und seine Mitarbeiter an der Bearbeitung dieses Gebietes mit einigen bemerkenswerten Arbeiten<sup>2)</sup> beteiligt, auf welche wir noch zurückzukommen Gelegenheit haben werden.

## II. Methodik.

Die in dieser Arbeit quantitativ festgestellten Saccharasewirkungen wurden sämtlich in der Weise ermittelt, daß die zu prüfende Hefe bei Zimmertemperatur direkt mit einer Zuckerlösung aufgeschlemmt wurde, die durch Zusatz von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf die für die Tätigkeit dieses Enzyms optimalen  $\text{pH}$ -Bedingungen gebracht worden war. Elektrometrische Kontrollbestimmungen an den Reaktionsmischungen ergaben  $\text{pH}$ -Zahlen 4,2—4,4. Die Zimmertemperatur schwankte freilich zwischen  $17^\circ$  und  $18^\circ$ , alle vergleichenden Versuche wurden aber gleichzeitig ausgeführt.

In trockenen, 250 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben wurden  $4,8 \pm 0,01$  g Rohrzucker eingewogen und in 10 ccm 4%iger  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung + 25 ccm Wasser gelöst. Die Hefe wurde — eventuell nach möglichst vollständiger Dekantation

---

<sup>1)</sup> Euler und B. af Ugglas, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. 3, (1910). Euler und Johansson, Diese Zeitschr. Bd. 76, S. 388; Bd. 78, S. 246 (1912) und Bd. 84, S. 97 (1913). Euler und Meyer, Diese Zeitschr. Bd. 79, S. 274 (1912). Euler und Cramér, Diese Zeitschr. Bd. 88, S. 430 und Bd. 89, S. 272 (1914) sowie Biochem. Zeitschr. Bd. 58, S. 467 und Bd. 67, S. 203 (1914). Euler, Biochem. Zeitschr. Bd. 85, S. 406 (1918).

<sup>2)</sup> Meisenheimer, Gambarjan und Semper, Biochem. Zeitschr. Bd. 54, S. 108 und 122 (1913) und Bd. 67, S. 364 (1914).

der Vorbehandlungsflüssigkeit — für sich in Wasser aufgeschlemmt und von der Aufschlemmung 25 ccm mit der Rohrzuckerlösung vermischt. Von dem Reaktionsgemisch wurden von Zeit zu Zeit unter Umschütteln 10 ccm in 10 ccm 1-n-Sodalösung hineinpipettiert. In dieser Sodalösung, wo die Sproßverbände der Hefe leicht auseinanderfallen, wurden die Hefezellen in Thoma-Zeißscher Zählkammer direkt unter dem Mikroskop gezählt, und zwar wurden so viele Parallelplatten gerechnet, bis eine Genauigkeit von etwa 4% erreicht worden war.

Die Proben wurden sodann zur Klarheit filtriert und im 5-cm-Rohr polarisiert.

Eine Korrektur für die Gärung brauchte bei den kurzen Inversionszeiten nicht angebracht zu werden. Zu den Enzymbildungsversuchen haben wir unsere Brauereihefe H der S:t Eric's Brauerei verwendet, da sie durch kräftige Enzymbildung und leichte Filtrierbarkeit wegen der Größe der Zellen besonders geeignet ist.

### III. Definition der Inversionsfähigkeit lebender Zellen.

Es war durch Versuche festgestellt worden, daß der relative Saccharasegehalt der Hefen ermittelt werden kann, indem man die lebenden Zellen direkt oder — bei längerer Versuchsdauer — unter Zusatz eines Protoplasmagiftes in einer Rohrzuckerlösung aufschlemmt und für die so eintretende Inversion die Konstanten  $k = 1/t \log(a/a-x)$  bestimmt. Bei gegebener Temperatur und Acidität ist derselbe konstant, und die Inversionsgeschwindigkeit ist, wie Euler und Kullberg<sup>1)</sup> angegeben haben, proportional der Hefenmenge<sup>2)</sup> bzw. der Zellenzahl, so daß für eine gegebene Hefenkultur unter den gleichen Bedingungen

$$\frac{k}{\text{Zellenzahl}}$$

<sup>1)</sup> Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 71, S. 23 (1911).

<sup>2)</sup> Ebenso wie die Gärungsgeschwindigkeit Aberson, Rec. Trav. Chim. Pays Bas. 22, 78; 1903.

konstant gesetzt werden kann<sup>1)</sup>. Innerhalb gewisser Grenzen ist dieser Quotient umgekehrt proportional dem Rohrzucker-gehalt der Lösung. Es wird dann die Inversionsfähigkeit, Inv., der Hefe angegeben durch den Ausdruck:

$$\text{Inv.} = \frac{k \cdot \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}}$$

Innerhalb der Grenzen:

0,4— 2 g Hefe (Trock. Gew. ca. 30%) } per 100 ccm  
8 —16 g Rohrzucker } Lösung

ist diese Größe wenig abhängig von den Mengen Hefe und Rohrzucker und wir schlagen vor, bei ähnlichen Bestimmungen diese Mengen per 100 ccm als Normalbedingungen zu wählen<sup>2)</sup>.

10 ccm 5%ige  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung  
45 ccm Wasser  
5 ccm Hefenaufschlemmung ✓

a			b		c	
9,6 g Rohrzucker = 16%			7,2 g Rohrzucker = 12%		4,8 g Rohrzucker = 8%	
Zellenzahl: $2,9 \cdot 10^9$			Zellenzahl: $2,8 \cdot 10^9$		Zellenzahl: $2,9 \cdot 10^9$	
Min.	Drehung	$k \cdot 10^4$	Drehung	$k \cdot 10^4$	Drehung	$k \cdot 10^4$
0	2,6	—	1,05	—	1,30	—
30	1,93	31	1,32	40	—	—
45	1,59	33	1,02	42	0,37	73
60	1,34	32	0,76	44	0,18	73
		32		42		73
Inv. = $10,6 \cdot 10^{-12}$			Inv. = $10,8 \cdot 10^{-12}$		Inv. = $12,1 \cdot 10^{-12}$	

Innerhalb der angegebenen Konzentrationsgrenzen gilt also die Beziehung:

$$\text{Inv.} = \frac{k \cdot \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}}$$

<sup>1)</sup> Euler und Cramér, Diese Zeitschr. Bd. 88, S. 437 (1913). Bezüglich der Bestimmung der Zellenzahl in dieser Arbeit s. S. 234.

<sup>2)</sup> Wie die vorliegenden Versuche zeigen, ist  $k \cdot \text{g Zucker}$  bei gegebener Zellenzahl zwischen den Konzentrationen 16% und 12% ganz konstant, mit abnehmender Zuckermenge nimmt das Produkt indessen etwas zu (Versuch c), entsprechend den früheren Bestimmungen von Kullberg (Diese Zeitschr. Bd. 71, S. 22 [1911]).

mit ausreichender Genauigkeit. Sollte sich später ergeben, daß die Inversionsfähigkeit lebender Zellen noch genauer reproduziert werden kann, so würde man noch engere Grenzen der Zuckerkonzentration zu wählen haben.

#### IV. Die Konstanz der Inversionsfähigkeit zweier Hefen während 8 bzw. 2 Jahren.

Die durch die Unterhefe H hervorgerufene Inversion haben wir seit 1911, diejenige der Oberhefe SB seit 1917 wiederholt quantitativ gemessen, und die folgenden Tabellen geben eine Zusammenstellung sämtlicher bis jetzt vorliegenden Bestimmungen aus unserem Laboratorium.

Es sind in diesen Tabellen die folgenden Größen angegeben worden:

$t^{\circ}$	=	Temperaturen bei den Inversionsversuchen in Celsiusgraden.
ccm	=	Volumina der Inversionsflüssigkeiten in ccm.
Rohr- zucker $\left\{ \begin{array}{l} \text{g} \\ \text{\%} \end{array} \right.$	=	Rohrzuckermenge in Gramm. = Rohrzuckermenge in Gramm pro 100 ccm Inversionsflüssigkeit.
Hefe $\left\{ \begin{array}{l} \text{g} \\ \text{\% Trock.} \end{array} \right.$	=	Hefemenge in Gramm. = Trockensubstanz der Hefe in Prozenten.

Die absoluten Zellenzahlen bei den Inversionsversuchen.

$k$	=	Reaktionskonstante $\frac{1}{t} \log \frac{R + L}{\alpha + L}$
		$t$ = Zeit in Minuten
		$\alpha$ = polarimetrische Ablesung
		$R$ = maximale Rechtsdrehung
		$L$ = maximale Linksdrehung
		$\log$ = dekadischer Logarithmus

$L$  wurde berechnet aus  $R$  nach der Gleichung

$L_{\max} = R_{\max} (0,44 - 0,005 t)$  [ $t$  = Temperatur bei der polarimetrischen Ablesung].

Sämtliche Messungen beziehen sich auf Optimalbedingungen der Acidität.

## 1. Hefe H; untergärige Brauereihefe.

Zellenzahl pro g Trockengewicht der Hefe:  $0,16 \cdot 10^{11}$ .

Tabelle 1.

Nr.	t°	ccm	Rohr- zucker		Hefe		Abs. Zellen- zahl	k	Inv. = $\frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{\text{Zellenzahl}}$
			g	%	g	% Trock. Gew.			
1.	16	20	2,22	11,1	0,1	30	$0,53 \cdot 10^9$	$24,3 \cdot 10^{-4}$	10,2-10-12
2.	17	60	4,8	8	[0,25	30	$0,13 \cdot 10^{10}$	$21,7 \cdot 10^{-4}$	8,0-10-12
3.	17	60	4,8	8	—	—	$0,175 \cdot 10^{10}$	$36 \cdot 10^{-4}$	9,9-10-12
4.	—	60	9,6	16	—	—	$0,29 \cdot 10^{10}$	$32 \cdot 10^{-4}$	10,6-10-12*
5.	—	60	7,2	12	—	—	$0,28 \cdot 10^{10}$	$42 \cdot 10^{-4}$	10,8-10-12*
6.	—	60	4,8	8	—	—	$0,29 \cdot 10^{10}$	$73 \cdot 10^{-4}$	12,1-10-12*
7.	17	25	4	16	0,25	—	—	—	13-19-10-12
8.	20	30	4	13,3	0,25	36,4	$0,145 \cdot 10^{10}$	$53 \cdot 10^{-4}$	10-10-12
9.	—	40	4	10	k · 10 <sup>8</sup>		$\frac{\text{Zellenzahl per mm}^3}{\text{---}}$	9,0	9,0-10-12
10.	19	30	4	13,3	0,25	32,7			
11.	19	30	4	13,3	0,25	31,3	$0,125 \cdot 10^{10}$	$34 \cdot 10^{-4}$	11-10-12
12.	17	60	4,8	8	0,47	(30)	$0,243 \cdot 10^{10}$	$62 \cdot 10^{-4}$	12,2-10-12
13.	17	60	4,8	8	0,47	(30)	$0,28 \cdot 10^{10}$	$54 \cdot 10^{-4}$	9,3 · 10-12†
14.	17	60	4,8	8	1,07	(30)	$0,64 \cdot 10^{10}$	$125 \cdot 10^{-4}$	9,35-10-12†
15.	17	60	4,8	8	0,5	(25)	$0,245 \cdot 10^{10}$	$32 \cdot 10^{-4}$	6,3-10-12
16.	—	60	4,8	8	0,50	—	$0,27 \cdot 10^{10}$	$47 \cdot 10^{-4}$	8,4-10-12
17.	—	60	4,8	8	0,52	—	$0,265 \cdot 10^{10}$	$46,5 \cdot 10^{-4}$	8,4-10-12
18.	—	60	4,8	8	0,46	—	$0,23 \cdot 10^{10}$	$52,5 \cdot 10^{-4}$	11 · 10-12

\* Gleichzeitige Versuche mit verschiedenen Zuckermengen. Vergl. oben.

† Gleichzeitige Versuche mit verschiedenen Hefemengen. Vergl. unten.

1. H. v. Euler u. Svanberg, Zeitschr. physiol. Chem. Bd. 98, S. 211 und 225 (1917). 2. O.S-g. 16/1 (1919). 3. O.S-g. 18.1 (1919). 4. 5. 6. O.S-g. 19/1 (1919). 7. H. v. Euler u. Kullberg, Zeitschr. physiol. Chem. Bd. 71, S. 16 (1911). 8. H. v. Euler u. Johansson, daselbst Bd. 84, S. 101 (1913). 9. H. v. Euler u. Cramér, daselbst Bd. 88, S. 437 (1913). 10. 11. S. Kullberg, daselbst Bd. 92, S. 347 (1914). 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. Vergl. unten (Ausgangshefen für die Enzymbildungsversuche) (1919).

Wie aus der Tabelle ersichtlich, zeigt die Hefe im Verlauf von 8 Jahren eine sehr bemerkenswerte Konstanz. Wir nehmen für die Temperatur  $17^{\circ}$  und die optimale Acidität  $p_{11} = 4,5$  den Mittelwert an

$$\text{Inv.} = \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{\text{Zellenzahl}} = 10 \pm 2 \cdot 10^{-12}.$$

Dabei ist noch zu bemerken, daß die von der Brauerei gelieferte Hefe gewaschen und dann ohne Vorbehandlung untersucht wurde, so daß die gefundenen Schwankungen durch zufällige Ungleichheiten in der Behandlung, wie tiefe Temperatur beim Transport, ungleiche Dauer des Waschens usw. hervorgerufen sein können.

Keinesfalls würde man früher vorausgesetzt haben, daß sich ein „normaler“ Enzymgehalt eines Stammes von Mikroorganismen mit solcher Genauigkeit angeben läßt.

## 2. Hefe S B. Brennerei-Oberhefe.

Die im hiesigen Laboratorium seit zwei Jahren untersuchte Oberhefe S B I bzw. S B II stammt aus Stockholms Södra Jästfabrik. Zellenzahl pro g Trockengewicht der Hefe:  $0,30 \cdot 10^{11}$ .

Tabelle 2.

Nr.	t°	ccm	g	%	g	% Trock. Gew.	Abs. Zellenzahl	k	Inv.
1.	27	100	10	10	0,2—0,4	(30)	—	—	4,3—5,6 · 10
2.	19	120	9,6	8	1,0	33,3	$0,10 \cdot 10^{11}$	$27 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^{-12}$
3.	16	60	4,8	8	0,28	—	$0,264 \cdot 10^{10}$	$21 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-12}$
4.	18	120	9,6	8	1,0	(30)	—	—	$3,0 \cdot 10^{-12}$

1. Euler u. Moberg, Arkiv f. Kemi 7 Nr. 12 (1918). — 2. Löfgren, noch nicht veröffentlichte Versuche. — 3. Siehe Seite 207. — 4. Löfgren Mittel aus 6 noch nicht veröffentlichten Versuchen.

Als Mittelwert für  $17^{\circ}$  und optimale Acidität geben wir an:

$$\text{Inv.} = 3,0 \pm 0,5 \cdot 10^{-12}.$$

Auch hier zeigt sich also, trotzdem die Messungen von verschiedenen Beobachtern und aus Versuchen mit etwas abweichender Methodik stammen, eine gute Konstanz der Inv.-Werte. Die Abweichungen liegen zum großen Teil innerhalb

der Versuchsfehlergrenzen und dürften also ohne Schwierigkeit auf 10 % vermindert werden können.

Besonders muß hier hervorgehoben werden, daß von der Konstanz einer Enzymwirkung in lebenden Zellen von Mikroorganismen nur insofern gesprochen werden kann, als diese Zellen die gleiche oder annähernd gleiche Vorgeschichte besitzen, besonders unter vergleichbaren Kulturbedingungen, Zusammensetzung der Nährlösung, Temperatur, Acidität gewachsen sind.

#### V. (Siche Tabelle S. 220.)

#### VI. Einfluß der Temperatur auf die Saccharasebildung.

Im Jahre 1907 hat H. Lange über die Veränderungen des Enzymbestandes der Hefe unter dem Einfluß verschiedener Temperaturen systematische Versuche angestellt. Er hat ruhende, fertige, abgepreßte Hefe untersucht, und zwar hinsichtlich Zymase, Saccharase und Peptase.

Was speziell die Saccharase betrifft, so wurde aus der Hefe, welche bei verschiedenen Temperaturen in Blechbüchsen gelagert worden war, von Zeit zu Zeit ein Preßsaft nach der Buchnerschen Methode hergestellt und die invertierende Kraft des Preßsaftes auf 60 %ige Rohrzuckerlösung untersucht.

Zur Bestimmung der invertierenden Wirkung des Preßsaftes wurde folgende Methode, welche sich in einer Reihe von Vorversuchen als zweckdienlich erwiesen hatte, zur Anwendung gebracht: 10 Reagensgläser des Reischauerschen Sternapparates wurden mit je 5 ccm einer 60 %igen, reinen Rohrzuckerlösung gefüllt und der Reihe nach mit 1, 2, 3—10 Tropfen des zu untersuchenden Preßsaftes versetzt. Nach gutem Durchschütteln wurden die Gläschen 5 Minuten lang bei einer Temperatur von 40° C. gehalten und sodann durch Zusatz von je 10 ccm Fehlingscher Lösung nach 20 Minuten langem Kochen dasjenige Reagensgläschen ermittelt, dessen Preßsaftmenge ausgereicht hätte, um die der völligen Reduktion der angewandten Fehlingschen Lösung entsprechende Menge Invertzucker zu bilden.

V. Übersicht über die bis jetzt bestimmten Inversionsfähigkeiten verschiedener Hefen<sup>1)</sup>.  
Tabelle 3.

Nr.	Hefe	Zellenzahl per g Trockeng.	t	Rohrzucker		g	% Trok- keng.	Abs. Zellenzahl	k	Inv. (Mittel)
				ccm	g					
1.	Unterhefe H . . .	0,16 · 10 <sup>11</sup>	17°	20—60	4—10	0,1—0,5	30	0,05—0,65 · 10 <sup>10</sup>	20—125 · 10 <sup>-4</sup>	10 · 10 <sup>-12</sup>
2.	Brennerei-Oberh.SB	0,30 · 10 <sup>11</sup>	17°	60—100	5—10	0,2—1	30	0,1—0,26 · 10 <sup>10</sup>	7—27 · 10 <sup>-4</sup>	3 · 10 <sup>-12</sup>
3.	Brau.-Oberh. Grönw.	—	17°	60	4,8	1 ccm Rohhefe	—	0,24 · 10 <sup>-10</sup>	37,5 · 10 <sup>-4</sup>	7,5 · 10 <sup>-12</sup>
4.	Brauerei-Unterh. "	—	17°	60	4,8	1 ccm Rohhefe	—	0,22 · 10 <sup>-10</sup>	59,5 · 10 <sup>-4</sup>	13,0 · 10 <sup>-12</sup>
5.	Lab. Kultur S. ellips.	0,47 · 10 <sup>11</sup>	30°	100	10	0,29	(30)	1,36 · 10 <sup>-10</sup>	65 · 10 <sup>-4</sup>	4,8 · 10 <sup>-12</sup>
6.	TorulaHansen (Svb.)	2,5 · 10 <sup>11</sup>	18°	100	8	—	—	31,5 · 10 <sup>-10</sup>	40 · 10 <sup>-4</sup>	0,11 · 10 <sup>-12</sup>
7.	Sacch. thermantiton.	—	17°	60	4,8	—	—	2,9 · 10 <sup>-9</sup>	30 · 10 <sup>-4</sup>	5 · 10 <sup>-12</sup>
			19°	100	8	—	—	2,8 · 10 <sup>-9</sup>	25 · 10 <sup>-4</sup>	7 · 10 <sup>-12</sup>

1. Siehe Tab. 1. — 2. Siehe Tab. 2. — 3—7. Euler, Svanberg, Laurin, noch nicht veröffentlichte Versuche.

<sup>1)</sup> Meisenheimer und Semper (Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 370 [1914]) arbeiten stets mit 0,2 g Unterhefe (ca. 30 %ig, aus der Schultheiß-Brauerei, Berlin) und invertieren 4 g Rohrzucker in 30 ccm Lösung bei 20°. Machen wir die willkürliche, aber vermutlich ziemlich genau zutreffende Annahme, daß auch diese Schultheiß-Hefe wie unsere Hefe H 0,16 · 10<sup>11</sup> Zellen per g Trockensubstanz enthält, so ergeben sich für die Ausgangshefe folgende Werte:

k 10 <sup>4</sup>	Inv. =	k 10 <sup>4</sup>	Inv. =
	Zellenzahl		Zellenzahl
17,5	7,3	14,4	6,0
20,5	8,5	22,9	9,6
22,9	9,6	23,9	10,0

Nach 24 stündiger Züchtung bei 25° in Würze ergibt eine analoge Berechnung: Inv. = 37 · 10<sup>-12</sup>, also einen Wert von der gleichen Größenordnung wie die im hiesigen Laboratorium erhaltenen. Siehe Kap. V. Abschnitt 2.

Die Resultate bezüglich der invertierenden Kraft des Preßsaftes sind folgendermaßen angegeben<sup>1)</sup>:

Untersuchte Hefen	Veränderung der invertierenden Kraft des Preßsaftes bei folgenden Lagerungstemperaturen:		
	Gelagert bei 6° R.	Gelagert bei 15° R.	Gelagert bei 22-23° R.
Rasse II	Nimmt <b>zu</b> bis zum 34. Tage.	Nimmt bis zum 8. Tag <b>zu</b> ; vom 14. Tag <b>ab</b> .	Nimmt bis zum 3. Tag <b>zu</b> , dann <b>ab</b> .
Rasse V	Nimmt bis z. 30. Tag <b>zu</b> , dann <b>ab</b> ; ging aber nur wenig unter die anfängliche.	Nimmt <b>zu</b> .	Nimmt anfangs <b>zu</b> , dann stetig <b>ab</b> .
Bierhefe	Stark, nimmt <b>zu</b> .	Stark, konstant.	Nimmt <b>ab</b> .

Der Grund, weshalb dieser Teil der Untersuchung Langes keine festeren Ergebnisse geliefert hat, liegt wohl zum großen Teil in der für diese Zeit naheliegenden, aber nicht zweckmäßigen Versuchsmethodik.

Die ersten systematischen Versuche, welche zahlenmäßige Ergebnisse über den Einfluß der Temperatur auf die Saccharasebildung geliefert haben, sind in der Mitteilung von Euler und Cramér<sup>2)</sup>: Einfluß von Temperatur und Luftzufuhr auf die Invertasebildung, enthalten. In dieser Arbeit wurde bereits einleitungsweise auf den Zusammenhang mit dem Temperaturkoeffizienten des Wachstums hingewiesen: „Für den Zuwachs der Hefe wie für die Bildung des Hefeneiweißes ergibt sich eine Temperaturkurve mit sehr stark ausgeprägtem Maximum, dessen Lage von verschiedenen Versuchsbedingungen abhängt, stets aber zwischen 10 und 40 liegt. Tatsächlich wurde auch gefunden, daß die Invertasebildung in lebender Hefe bei der Temperatur von 16 rascher vor sich geht als bei 39°.“

Die Lage des Maximums der Invertasebildung ist damals nicht untersucht worden. Im Zusammenhang mit anderen Arbeiten haben wir uns jetzt veranlaßt gesehen, auf die be-

<sup>1)</sup> H. Lange, Wochenschr. f. Brauerei Bd. 24, S. 417 (1907).

<sup>2)</sup> Euler und Cramér, Diese Zeitschr. Bd. 89, S. 272 (1914).

gonnene Untersuchung wieder zurückzukommen und nun durch Aufstellung einer Temperaturkurve die hierhergehörenden Verhältnisse endgültig aufzuklären.

Etwa  $\frac{1}{2}$  Jahr nach unserer ersten Mitteilung über den Einfluß der Temperatur auf die Invertasebildung haben Meisenheimer und Semper<sup>1)</sup> Versuche über den gleichen Gegenstand veröffentlicht, auf welche wir bei der Diskussion unserer Ergebnisse noch zurückkommen.

### 1. Vorversuche über die Optimaltemperatur des Zellenzuwachses.

Da nach unserer Annahme die Enzyymbildung mit der Neubildung von Protoplasma eng verknüpft ist, so war, wie schon erwähnt, die Beziehung zwischen der Temperaturkurve der Enzyymbildung und derjenigen des Wachstums zu suchen.

Nach Henneberg liegt das Maximum des Zuwachses für

Unterhefe Froberg bei 35°

Unterhefe Saaz bei 33°.

Wir haben mit unserer Laboratoriums-Reinkultur „Frohberg“ einige Versuche zur Festlegung der Zuwachs-Temperaturkurve angestellt. Die Zellen wurden direkt in der Thoma-Zeißschen Rechenkammer gezählt.

Als Nährsubstrat diente ein Dekokt von 40 g Trockenhefe in 1 Liter Leitungswasser. Nach Abkühlung und Filtration enthielt derselbe 1,16% Extraktivstoffe; sie wurde außerdem mit 1,5% Rohrzucker versetzt.

#### Versuch 1.

Stunden	Relative Zellenzahl		
	18°	30°	35°
0	100	100	100
5	—	125	97
9	136	208	88
22	166	303	82*)
28	192	329	82

\*) Hefe z. T. in Autolyse; viele tote Zellen, welche unmittelbar von Methylenblau gefärbt werden.

<sup>1)</sup> Meisenheimer und Semper, Biochem. Zeitschr. Bd. 67. S. 364 (1914).

## Versuch 2.

Stunden	Relative Zellenzahl		
	18°	25°	30°
9	100	100	100
4	111	150	193
17	223	460	237

Es handelt sich bei diesen wenigen Versuchen nur um vorläufige Bestimmungen, welche bald durch eingehendere Zuwachsmessungen unter Variation der maßgebenden Bedingungen, Acidität und Zusammensetzung der Nährlösung ergänzt werden sollen.

Wie bereits aus den beiden Tabellen hervorgeht, liegt bei der längeren Versuchsdauer von 17 Stunden die Optimaltemperatur des Zuwachses tiefer (etwa bei 25°) als bei der kürzeren Versuchsdauer von 4 Stunden, welche eine Optimaltemperatur von etwa 30° ergab. Dies hängt zweifellos damit zusammen, daß bei höherer Temperatur die mittlere Lebensdauer und die schließliche Ernte der Zellen geringer ist als bei tiefer Temperatur. So wurden bei einem mit der gleichen Froberg-Hefe angestellten Zuwachsversuch folgende Ausbeuten erhalten:

Nährlösung wie oben, Hefenwasser mit 1,5% Rohrzucker, in zwei 100 ccm-Kolben. Einimpfung mit einer Platinaöse. Versuchszeit: 9 Tage.

Temperatur	Zellen per mm <sup>3</sup> (Mittel)
18	36500
30	14500
32	10000 <sup>1)</sup>
35	0

<sup>1)</sup> Nach 2 Über-Impfungen: 10250

„ 3 „ 8700

„ 4 „ 9400

In der Versuchszeit hat sich also der Zuwachs nicht geändert, eine Anpassung an die Temperatur 32° hat in dieser verhältnismäßig kurzen Zeit noch nicht stattgefunden.

## 2. Neue Versuche über den Temperatureinfluß.

## Versuchsreihe 1.

Unvorbehandelte Hefe: 0,47 g der gewaschenen und auf den Trockengehalt 30% abgepreßten Unterhefe H wurden zur Inversion von 60 ccm einer 8%igen Rohrzuckerlösung verwandt. Von Zeit zu Zeit wurden 10 ccm Lösung in 10 ccm 5%ige Sodalösung einpipetiert. Es wurde gefunden (Beilage 1)

$$k = 62 \cdot 10^{-4}$$

Die Zellenzahl betrug:  $0,243 \cdot 10^{10}$ , und daraus berechnet sich

$$\text{Inv.} = \frac{k \cdot \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}} = 12,2 \cdot 10^{-12}$$

Vorbehandlung: Je 1 g der ca. 30%igen Hefe wurde in folgender Lösung aufgeschlemmt:

0,025 g	MgSO <sub>4</sub>
0,05 g	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,5 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,0 g	Asparagin
2,0 g	Rohrzucker
<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/>	

100,0 ccm Wasser.

Nach 40stündiger Vorbehandlung bei den Temperaturen 18°, 30° und 35° wurde die obige, vergorene Lösung abdekantiert und die Aktivität wurde wie bei der unvorbehandelten Hefe bei Zimmertemperatur, 16—18°, untersucht.

a) Vorbehandlung bei 18°: Beilage 2

$$k = 195 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,39 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 24 \cdot 10^{-12}$$

c) Vorbehandlung bei 30°: Beilage 3

$$k = 165 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,34 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 23 \cdot 10^{-12}$$

d) Vorbehandlung bei 35°: Beilage 4.

$$k = 62 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,27 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 11 \cdot 10^{-12}$$

Diese erste Versuchsreihe zeigte also, daß bei 35°, der Maximaltemperatur des Wachstums der Froberg-Hefe, keine Saccharasebildung mehr nachgewiesen werden kann. Nach obigem Versuche ist das Optimum bei einer Versuchszeit von 40 Stunden zwischen 18 und 30 zu suchen.

Nach der 40stündigen Vorbehandlung bei 18, 24, 30 und 35° wurde jeder Kolben aufs neue mit 2 g Rohrzucker versetzt und die Vorbehandlung wurde während weiterer 20 Stunden fortgesetzt. Hierauf wurde die Inversionsfähigkeit wie früher bestimmt.

a 2. Vorbehandlung bei 18°: Beilage 5

$$k = 256 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,50 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 24,5 \cdot 10^{-12}$$

b 2. Vorbehandlung bei 24°: Beilage 6

$$k = 302 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,50 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 29 \cdot 10^{-12}$$

Fast alle Zellen lebend und sprossend.

c 2. Vorbehandlung bei 30°: Beilage 7

$$k = 183 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,39 \cdot 10^{10}$$

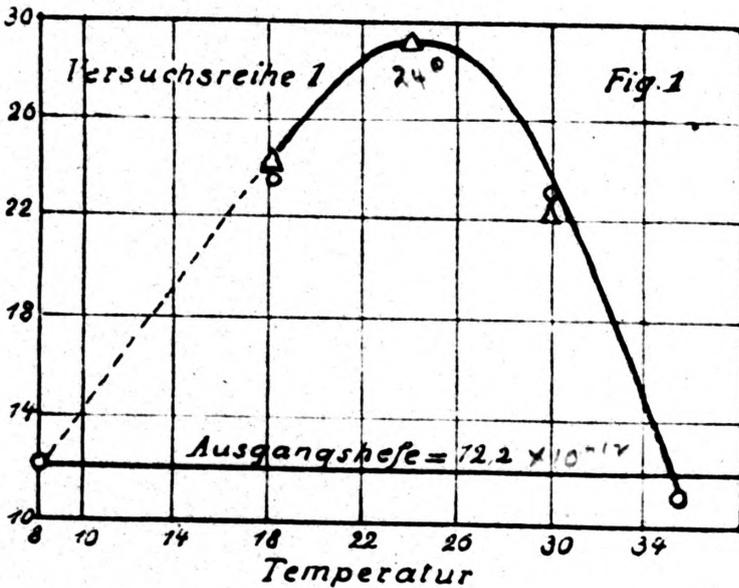
$$\text{Inv.} = 22,5 \cdot 10^{-12}$$

Ein bedeutender Teil der Zellen ist tot und direkt färbbar mit Methylenblau.

d 2. Vorbehandlung bei 35°:

Die Hefe befindet sich im Auflösungszustand und läßt sich nicht abfiltrieren. Ein großer Teil ist autolytisch, die meisten Zellen, etwa 75%, sind tot und lassen sich mit Methylenblau direkt färben. Immerhin konnten zwischen der Überzahl von toten Zellen einige junge Sproßverbände beobachtet werden.

Wir stellen die in dieser Versuchsreihe erhaltenen Punkte in der Figur 1 zusammen. Man kann aus derselben entnehmen, daß das Optimum der Saccharasebildung unserer Hefe bei oder über 24° liegt.



## Versuchsreihe 2.

Unvorbehandelte Hefe: 0,47 g der gewaschenen und auf den Trockengehalt 30% abgepressten Unterhefe H werden zur Inversion von 60 ccm einer 8%igen Rohrzuckerlösung verwandt. Es wurde gefunden:

Beilage 8

$$k = 54 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,28 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 9,3 \cdot 10^{-12}$$

Beilage 9

$$k = 125 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,64 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 9,35 \cdot 10^{-12}$$

Vorbehandlung: 1 g der ca. 30%igen Hefe wurde in folgender Lösung aufgeschlemmt:

0,025 g  $\text{MgSO}_4$ 0,5 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 

2 g Rohrzucker

100,0 ccm

Der Asparaginstickstoff war hier durch Ammoniumstickstoff ersetzt, ein Umstand, welcher indessen keinen wahrnehmbaren Einfluß auf die Enzymbildung ausübte.

Nach 24stündiger Vorbehandlung wurde die Lösung abdekantiert und die Inversionsfähigkeit wurde wieder bei Zimmertemperatur untersucht.

## 2a. Vorbehandlung bei 18°: Beilage 10

$$k = 163 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,39 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 20 \cdot 10^{-12}$$

## 2b. Vorbehandlung bei 23,5°: Beilage 11

$$k = 244 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,44 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 26,5 \cdot 10^{-12}$$

## 2c. Vorbehandlung bei 27,5°: Beilage 12

$$k = 264 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,41 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 31 \cdot 10^{-12}$$

## 2d. Vorbehandlung bei 32,5°: Beilage 13

$$k = 180 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,31 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 28 \cdot 10^{-12}$$

Nach dieser 24stündigen Vorbehandlung blieb die Hefe bei 18° weitere 24 Stunden mit der Lösung in Berührung, worauf die Inversionsfähigkeit aufs neue bestimmt wurde.

2a 2. Vorbehandlung 24 Std. bei 18° + 24 Std. bei 18°:  
Beilage 14

$$k = 185 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,39 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 23 \cdot 10^{-12}$$

2b 2. Vorbehandlung 24 Std. bei 23,5° + 24 Std. bei  
18°: Beilage 15

$$k = 265 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,44 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 29 \cdot 10^{-12}$$

2c 2. Vorbehandlung 24 Std. bei 27,5° + 24 Std. bei  
18°: Beilage 16

$$k = 262 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,41 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 31 \cdot 10^{-12}$$

2d 2. Vorbehandlung 24 Std. bei 32,5° + 24 Std. bei  
18°: Beilage 17

$$k = 177 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,30 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 28,5 \cdot 10^{-12}$$

Die 24 Stunden bei  $23,5^{\circ}$  und bei  $32,5^{\circ}$  vorbehandelte Hefe wurde in der Versuchsreihe 2 (3) weitergeführt.

2b 3. Vorbehandlung 72 Std. bei  $23,5^{\circ}$ : Beil. 18

$$k = 273 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,44 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 30 \cdot 10^{-12}$$

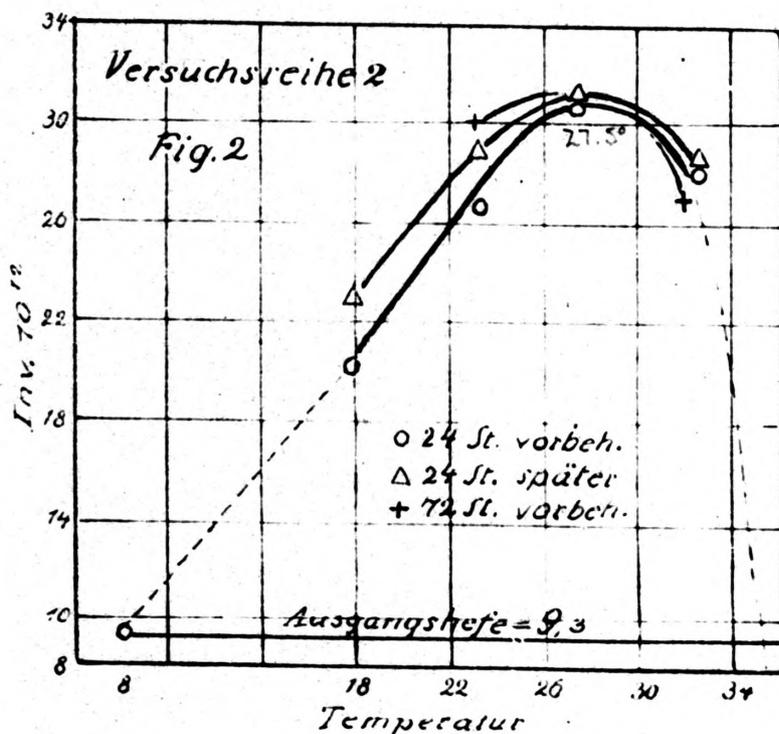
2d 3. Vorbehandlung 72 Std. bei  $32,5^{\circ}$ : Beil. 19

$$k = 175 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,31 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 27 \cdot 10^{-12}$$

Eine Zusammenstellung der Versuchsreihe 2 liefert nun das folgende Bild (Fig. 2). Aus demselben ersehen wir, daß das Optimum der Saccharasebildung unserer Hefe nahe bei  $27,5^{\circ}$  liegt.



Zellenzuwachs während der Vorbehandlung.

Es wurde untersucht, ob etwa das in den Versuchsreihen 1 und 2 gefundene Optimum der Saccharasebildung mit demjenigen des Zellenzuwachses zusammenfällt.

## Versuchsreihe 1.

Vorbehandlung bei der Temperatur	Zellenzuwachs in % nach	
	40 Stunden	60 Stunden
18°	39 ± 2	78 ± 2
24°	50	78
30°	21	39
35°	3	—

Nach der ersten Zellenzählung nach 40 Stunden wurden die Nährlösungen mit 2% Rohrzucker versetzt.

## Versuchsreihe 2.

Vorbehandlung bei der Temperatur	Zellenzuwachs in % nach	
	24 Stunden	72 Stunden
18°	39 ± 2	—
23,5°	57	57
27,5°	46	—
32,5°	10	10

Zwischen den Zellenzählungen fand bei Versuchsreihe 2 kein Zuckerzusatz statt.

Diesen Versuchen zufolge liegt das Optimum des Zellenzuwachses in der Nähe von 23,5°, während das Optimum der Saccharasebildung näher bei 27,5° gefunden worden war.

## Versuchsreihe 3.

Unvorbehandelte Hefe: 0,5 g der gewaschenen und auf ca. 25% Trockengehalt abgepressten Unterhefe H wurden zur Inversion von 60 ccm einer 8%igen Rohrzuckerlösung verwandt. Diese Lösung war 0,7%ig in Bezug auf  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; nach elektrometrischer Messung war  $p_{\text{H}} = 4,4$ . Methodik wie in Versuchsreihe 1. Beilage 20.

$$k = 32 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,245 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 6,3 \cdot 10^{-12}$$

Ein Vergleich mit den Versuchsreihen 1 und 2 und auch mit früheren Bestimmungen zeigt, daß hier ein ungewöhnlich niedriger Saccharasegehalt vorliegt.

Vorbehandlung. Je 1 g frische Hefe wurde in 8 Kolben von 200 ccm eingewogen und in 100 ccm folgender Lösung aufgeschlemmt:

0,025 g	MgSO <sub>4</sub>
0,5 g	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,5 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,0 g	Rohrzucker
100,0 ccm	

Die Acidität der Lösung entspricht  $p_H = 5,98$ .

Nach 24stündiger Vorbehandlung werden die Lösungen abdekantiert und die Hefe wird in jedem Kolben mit 50 ccm Wasser aufgeschlemmt. Von dieser Emulsion werden 25 ccm direkt zu Inversionsversuchen verwendet, die übrigen 25 ccm zu Inversionsversuchen unter Zusatz von Toluol (24 Stunden später).

Serie 1.

3a. Vorbehandlung 24 Std. bei 18°: Beil. 21

$$k = 120 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,31 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 18,5 \cdot 10^{-12}$$

3b. Vorbehandlung 24 Std. bei 24°: Beil. 22

$$k = 151 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,32 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 22,5 \cdot 10^{-12}$$

3c. Vorbehandlung 24 Std. bei 28°: Beil. 23

$$k = 196 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,31 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 30,5 \cdot 10^{-12}$$

3d. Vorbehandlung 24 Std. bei 32°: Beil. 24

$$k = 122 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,20 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 24,5 \cdot 10^{-12}$$

Serie 2.

Nach weiteren 24 Stunden wurden entsprechende Inversionsversuche unter Zusatz von 0,5 ccm Toluol zu jedem Kolben angestellt.

3a 2. Vorbehandlung 24 Std. bei 18° + 24 Std. bei 18°  
m. Tol.: Beil. 25

$$k = 130 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,31 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 20 \cdot 10^{-12}$$

3b 2. Vorbehandlung 24 Std. bei  $24^{\circ}$  + 24 Std. bei  $18^{\circ}$   
m. Tol.: Beil. 26

$$k = 161 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,32 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 24 \cdot 10^{-12}$$

3c 2. Vorbehandlung 24 Std. bei  $28^{\circ}$  + 24 Std. bei  $18^{\circ}$   
m. Tol.: Beil. 27

$$k = 191 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,31 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 30 \cdot 10^{-12}$$

3d 2. Vorbehandlung 24 Std. bei  $32^{\circ}$  + 24 Std. bei  $18^{\circ}$   
m. Tol.: Beil. 28

$$k = 111 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,24 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 22 \cdot 10^{-12}$$

Serie 3.

Aus einer Anzahl von Kolben, welche während 24 Stunden bei den Temperaturen  $18^{\circ}$ ,  $24^{\circ}$ ,  $28^{\circ}$  und  $32^{\circ}$  vorbehandelt worden waren, wurden die Lösungen abdekantiert und die Hefe wurde von neuem mit je 100 ccm der oben angegebenen Vorbehandlungslösungen aufgeschlemmt. Hierauf fand eine weitere Vorbehandlung während 48 Stunden bei den entsprechenden Temperaturen statt. Die Inversionsversuche wurden hierauf, wie immer, bei Zimmertemperatur ausgeführt.

3a 3. Vorbehandlung 24 Std. bei  $18^{\circ}$  + 48 Std. bei  $18^{\circ}$ :  
Beil. 29

$$k = 209 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,39 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 26 \cdot 10^{-12}$$

3b 3. Vorbehandlung 24 Std. bei  $24^{\circ}$  + 48 Std. bei  $24^{\circ}$ :  
Beil. 30

$$k = 281 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,38 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 35,5 \cdot 10^{-12}$$

3c 3. Vorbehandlung 24 Std. bei 28° + 48 Std. bei 28°:  
Beil. 31

$$k = 261 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,35 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 36 \cdot 10^{-12}$$

3d 3. Vorbehandlung 24 Std. bei 32° + 48 Std. bei 32°:  
Beil. 32

$$k = 202 \cdot 10^{-4}$$

In den Vorbehandlungskolben trat bei 28° und besonders bei 32° eine sehr kräftige Infektion durch kurze Stabbakterien ein, namentlich die gewöhnlichen Begleiter der Unterhefe, *Bacillus Lindneri* (Henneberg). Bei 32° bestand vermutlich ein erheblicher Teil des Bodensatzes aus Bakterienzellen. Die Hefe war bei dieser Temperatur stark agglutiniert und die Zellverbände trennten sich auch in den mit Soda versetzten Kolben nicht; aus diesem Grund ließ sich die Zellenzahl nur schwierig bestimmen. Da indessen nach 24stündiger Vorbehandlung die Zellenzahl bei 32° nicht zugenommen hatte, dürfte man als Maximumwert annehmen können

$$\text{Zellenzahl} = 0,25 \cdot 10^{10}$$

und hieraus

$$\text{Inv.} = 39 \cdot 10^{-12}$$

ein Wert, welcher mit dem des vorigen Versuches gut übereinstimmt.

#### Serie 4.

Zu der Vorbehandlung der Serie 3 kam nun noch eine weitere 24stündige Vorbehandlung bei den entsprechenden Temperaturen.

3a 4. Vorbehandlung 24 Std. + 48 Std. + 24 Std. bei 18°:  
Beil. 33

$$k = 336 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,43 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 37,5 \cdot 10^{-12}$$

3b 4. Vorbehandlung 24 Std. + 48 Std. + 24 Std. bei 24°:  
Beil. 34

$$k = 431 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,43 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 48 \cdot 10^{-12}$$

3c 4. Vorbehandlung 24 Std. + 48 Std. + 24 Std. bei 28°:  
Beil. 35

$$k = 379 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,38 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv} = 49 \cdot 10^{-12}$$

3d 4. Vorbehandlung 24 Std. + 48 Std. + 24 Std. bei 32°:  
Beil. 36

$$k = 258 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,25 \cdot 10^{10} (?)$$

$$\text{Inv.} = 49,5 \cdot 10^{-12} ?$$

Auch hier gilt bezüglich des Zustandes der bei 32° vorbehandelten Hefe natürlich das gleiche, wie bereits zum Versuch 3d 3 gesagt wurde: durch Infektion und Autolyse ist die Zellenzählung sehr unsicher. Wir berücksichtigen daher diese beiden Punkte in der graphischen Zusammenstellung der Versuchsreihe 3, Fig. 3 nicht.

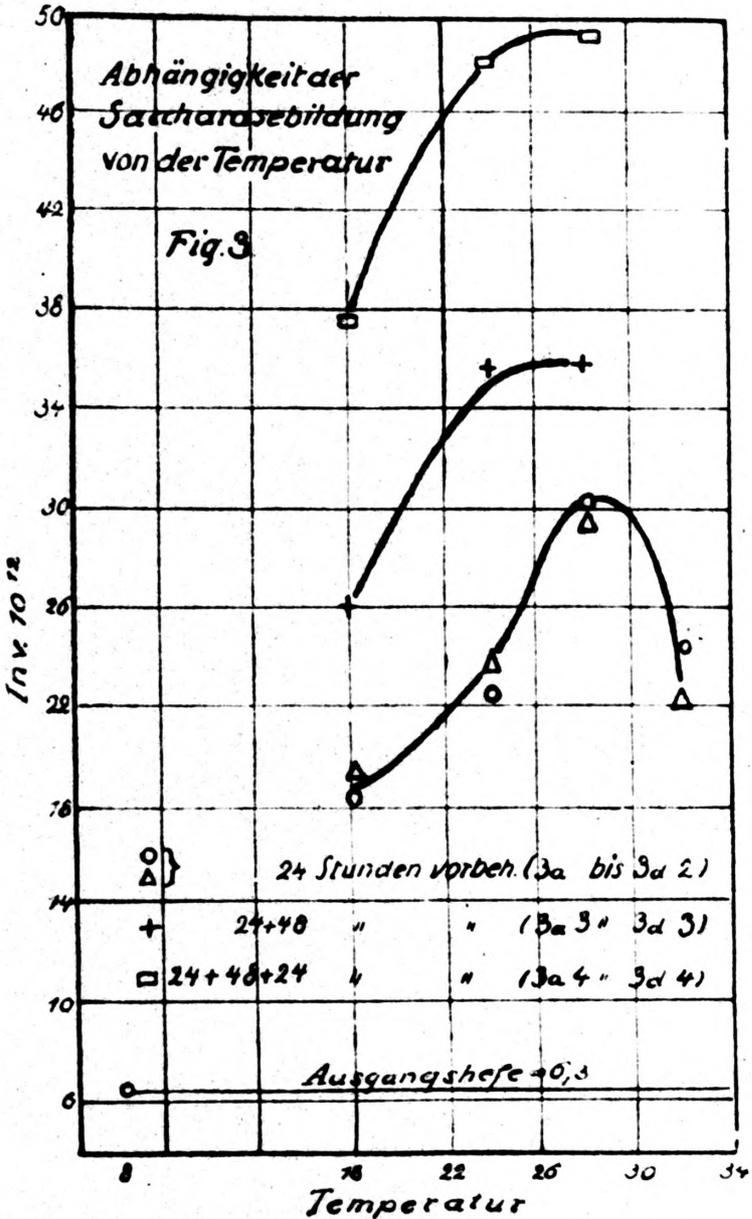
Als Ergebnis unserer Untersuchung können wir der Figur 3, S. 234, entnehmen, daß unsere Unterhefe H ein ausgesprochenes Maximum der Saccharasebildung zwischen 26° und 30°, bei etwa 28°, zeigt.

Leider haben Meisenheimer und Semper<sup>1)</sup> bei ihrer, gleichfalls an einer Unterhefe ausgeführten sorgfältigen Untersuchung die Lage des Maximums der Enzyymbildung zwischen 25° und 35° nicht ermittelt. Eine deutliche Verschiedenheit hinsichtlich des Temperatureinflusses macht sich insofern bemerkbar, als Meisenheimer und Semper bei 35° noch eine erhebliche Enzyymbildung finden, während wir bei 35° keine Saccharasebildung mehr feststellen konnten<sup>2)</sup>. Indessen fanden auch die genannten Autoren die Saccharasebildung bei 35° geringer als bei 25°, so daß auch bei ihrer Hefe das Optimum sicher unter 35° liegt.

<sup>1)</sup> Meisenheimer und Semper, Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 364 (1914).

<sup>2)</sup> Wie es kommt, daß Cramér (Diese Zeitschr. Bd. 89, S. 272 [1913]) bei 39° noch eine Enzyymbildung fand, können wir nicht mehr ermitteln. Jedenfalls kann diese Angabe, welche sich nur auf einen einzigen Versuch stützt, nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Wie S. 229 betont, fällt das Optimum der Saccharosebildung zwar nicht ganz mit dem Optimum des Zellenzuwachses zusammen, liegt aber doch nur 3 Grade von ihm entfernt, so



daß die von Euler und Cramér vermutete Beziehung zwischen Zellenzuwachs und Enzymbildung (l. c. S. 272) durch unsere Versuche bestätigt wird<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Vergl. hierzu auch A. Kanitz, Zeitschr. für Elektrochem. 13, 707 (1907).

## VII. Die Abhängigkeit der Saccharasebildung von der Acidität.

Bei den im vorhergehenden Kapitel mitgeteilten Vorbehandlungen bei verschiedenen Temperaturen befand sich die Hefe in Lösungen, deren Acidität  $p_H = 5,9 - 6,0$  betrug.

Bei der starken Abhängigkeit sowohl der Hefegärung und Inversion als auch des Zuwachses von der Acidität war zu erwarten, daß auch die Saccharasebildung durch die Konzentration der freien  $H'$ - und  $OH'$ -Ionen nicht unwesentlich beeinflußt wird. Auf diesen Umstand hat auch bereits Fernbach<sup>1)</sup> auf Grund eigener Versuche aufmerksam gemacht. Die Methodik, welche damals zur Verfügung stand, hat allerdings eine genauere Feststellung der geltenden Beziehung nicht gestattet. Für uns war die Kenntnis dieser Beziehung von Interesse auch in Rücksicht auf unsere in größerem Maßstab durchgeführten Anreicherungen des Saccharasegehalts der Hefe zum Zweck der Reindarstellung dieses Enzyms.

Die Versuchsmethodik war genau dieselbe wie bei den im vorigen Kapitel beschriebenen Versuchen. Die  $p_H$ -Bestimmungen geschahen im wesentlichen elektrometrisch nach Sörensen-Michaelis.

### Versuchsreihe 1.

Unvorbehandelte Hefe: 0,52 g frische Hefe H in 60 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung: Beil. 37

$$k = 46,5 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,265 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = \frac{k \cdot \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}} = 8,4 \cdot 10^{-12}$$

Die Vorbehandlung geschah in folgender Lösung:

5 g  $NH_4H_2PO_4$

4 g  $KH_2PO_4$

20 g Rohrzucker

100 ccm Lösung.

Je 1 g Hefe wurde in 100 ccm dieser Lösung während 24 Stunden vorbehandelt, und zwar bei verschiedener Acidität, welche durch Zusatz von 4-n.  $H_2SO_4$  hergestellt wurde.

<sup>1)</sup> Fernbach, Ann. Inst. Pasteur Bd. 4 (1890).

Lösung	pH	
	vor der Vorbehandlung	nach 24 stündiger Vorbehandlung
100 ccm Lösung ohne H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . .	6,0	5,7
100 ccm Lösung + 0,67 ccm H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,7	2,6
100 ccm Lösung + 2,0 ccm H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,7	1,65

Die Ergebnisse sind aus folgender Tabelle ersichtlich. Es soll noch besonders betont werden, daß die Inversionskonstanten immer bei optimalem p<sub>H</sub> gemessen worden sind, unabhängig davon, bei welcher Acidität die Vorbehandlung erfolgt ist.

pH	k · 10 <sup>4</sup>	Zellenzahl	Beil.	Inv.	Inv.-Änderung in % des urspr. Wertes
6,0 — 5,7	120	0,32 · 10 <sup>10</sup>	38	18 · 10 <sup>-12</sup>	+ 110 %
2,7 — 2,6	69	0,26 · 10 <sup>10</sup>	39	12,5 · 10 <sup>-12</sup>	+ 50 %
1,7 — 1,65	6,1	0,21 · 10 <sup>10</sup>	40	1,4 · 10 <sup>-12</sup>	— 83 %

Bei starker Acidität, besonders bei p<sub>H</sub> = 1,7 — 1,65, superponiert sich über die Saccharasebildung die Zerstörung des Enzyms, welche von der freien Säure stark beschleunigt wird und schließlich die Enzymbildung überwiegt.

Nach diesen orientierenden Versuchen wurde die Aciditätskurve der Saccharasebildung durch folgende umfassendere Versuchsreihe festgelegt.

#### Versuchsreihe 2.

Unvorbehandelte Hefe: 0,46 g Hefe H in 60 ccm 8 %iger Rohrzuckerlösung: Beil. 41

$$k = 52,5 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 0,23 \cdot 10^{10}$$

$$\text{Inv.} = 11 \cdot 10^{-12}$$

Die Vorbehandlung geschah in Lösungen von der gleichen Zusammensetzung wie in der vorhergehenden Versuchsreihe 1. Die folgende Tabelle gibt die Zusätze und die erzeugten Aciditäten an.

Bez.	Zusätze zu je 100 ccm Lösung	PH		
		vor der Vorbehandlung	nach 24 stünd. Vorbehandlung	Mittel
a	2,4 ccm 2-n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,10	2,12	2,1
b	0,9 „ „	3,0	2,86	2,9
c	0,7 „ „	4,35	3,2	3,8
d	0,5 „ „	5,3	4,3	4,8
e	—	6,0	5,6	5,8
f	2,0 ccm 2-n. NaOH	7,3	6,8	7,0
g	2,85 „ „	8,5	6,7	7,6

Lösung f wurde während der Vorbehandlung noch mit 1,5 ccm 2-n. NaOH versetzt.

Lösung g wurde während der Vorbehandlung noch mit 1,75 ccm 2-n. NaOH versetzt.

Die geringe Aciditätsänderung in Lösung e erklärt sich durch die starke Pufferwirkung der Phosphate in diesem Gebiet.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt; in der letzten Spalte findet man die für die gleiche Nährlösung geltenden Resultate der Zuwachsversuche angeführt.

Bez.	PH	k · 10 <sup>4</sup>	Beil.	Zellenzahl · 10 <sup>-10</sup>	Inv. 10 <sup>12</sup>	Zellenzahl · 10 <sup>-10</sup>
						Zugesetzt: 0,46 · 10 <sup>10</sup> Zell.
a	2,1	72,5	42	0,23	15	0,46
b	2,9	139	43	0,24	28	0,48
c	4,35 — 3,2	170	44	0,275	29,5	0,55
d	5,3 — 4,3	209	45	0,31 <sup>✓</sup>	32,5 <sup>✓</sup>	0,62
e	6,0 — 5,6	196	46	0,29	32,5 <sup>✓</sup>	0,58
f	7,3 — 6,8	149	47	0,23	31	0,46
g	8,5 — 6,7	143	48	0,23	30	0,46

Die Figuren 4 und 5 zeigen die Abhängigkeit der Saccharasebildung von der Azidität graphisch. Besonders wollen wir die Aufmerksamkeit auf die Versuche a, b, f und g der obigen Tabelle lenken. Während nämlich im allgemeinen diejenigen Einflüsse, unter welchen eine Neubildung des Protoplasmas bzw. ein Zellenzuwachs eintritt, auch die Saccharasebildung

bedingen, zeigt sich hier, daß auch bei Aciditäten, in welchen ein Zellenzuwachs nicht mehr stattfindet, die Inversionsgeschwindigkeit der Hefe noch um etwa 100 % gesteigert werden kann.

### VIII. Enzymgehalt in ausgewaschener und nicht ausgewaschener Hefe.

Bei den Versuchen aus den Jahren 1911—1916 war die zur Enzyymbildung aus der Brauerei bezogene Hefe sorgfältig ausgewaschen worden.

Da nun die Erhöhung des Saccharasegehaltes der Hefe in größerem Maßstab ausgeführt werden sollte, wurde untersucht, ob und in welchem Grade das Auswaschen der frischen Bierhefe die Saccharasewirkung und die Saccharasebildung beeinflusst.

#### Versuch 1.

Normalzustand. Inversion in 60 ccm Lösung, enthaltend ca. 0,8 %  $\text{PO}_4$ . Zu jedem Versuch werden  $4,8 \pm 0,03$  g Rohrzucker eingewogen; die Hefe wurde zugesetzt in Form von 1 ccm ungewaschener und unvorbehandelter „Rohhefe“, wie sie aus der Brauerei kam. Die Zellenzahl wurde in der invertierenden Lösung bestimmt; sie betrug  $1,30 \cdot 10^9$  in 60 ccm, was sehr angenähert einer Gewichtsmenge von 0,25 g Hefe von 30 % Trockengewicht entspricht. Beilage 49.

$$k = 21,7 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 1,30 \cdot 10^9$$

$$\text{Inv.} = 8,0 \cdot 10^{-12}$$

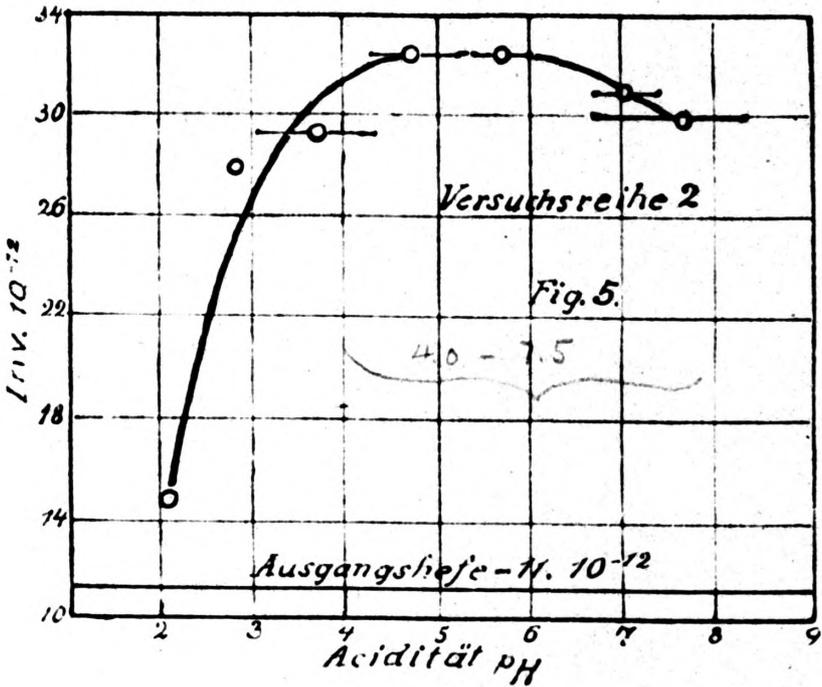
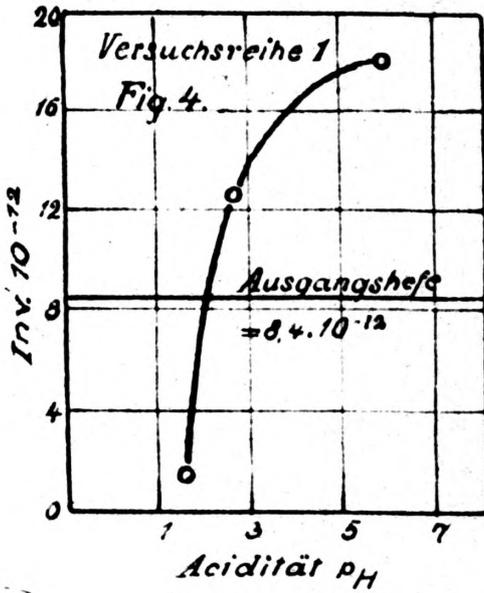
#### Versuch 2.

600 ccm der gleichen Rohhefe wurden mit dem gleichen Volumen Leitungswasser vermischt und mit 24 g = 2 % Rohrzucker versetzt. Die Vergärung wurde bei 25° ausgeführt (Gärungsgefäß im Thermostaten). Bereits nach  $\frac{1}{4}$  Stunde trat kräftige Gärung ein. Nach 18 Stunden wurde die Vorbehandlung abgebrochen und der Inversionsversuch wie bei Versuch 1 ausgeführt. Beilage 50.

$$k \cdot = 36,6 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Zellenzahl} = 1,76 \cdot 10^7$$

$$\text{Inv.} = \frac{k \cdot \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}} = 10,0 \cdot 10^{-12}$$



Versuch 3.

Die im Versuch 2 angewandte Hefe wurde während 6 Stunden bei  $9^{\circ}$  im strömenden Wasserleitungswasser ausgewaschen. Die Hefe setzte sich dann über Nacht ab und wurde mit Leitungswasser zu einer Emulsion angerührt. Von dieser Emulsion wurden 3 ccm zu einem dem obigen analogen Inversionsversuch

in 60 ccm verwandt. Zellenzahl:  $1,75 \cdot 10^9$  in 60 ccm Inversionslösung.

Mittel der Konstanten: Beilage 51.

$$k = 36 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Inv.} = 9,9 \cdot 10^{-12}$$

Die Inversionsfähigkeit ist also in diesem Versuch wenig verschieden von der im Versuch 1 gefundenen, und wird also durch das Auswaschen weder vermindert noch wesentlich verbessert.

#### Versuch 4.

Etwa 5 g einer 30%igen, gut ausgewaschenen Hefe wurden in 100 ccm folgender Lösung aufgeschlemmt:

0,025 g  $\text{MgSO}_4$

100 ccm 5%ige  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung

0,05 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

2 g Rohrzucker.

In dieser Lösung wurde die Hefe bei  $+24^\circ$  während 18 Stunden vorbehandelt. 5 ccm dieser Emulsion zu einem Inversionsversuch mit 60 ccm. Zellenzahl:  $1,38 \cdot 10^9$ .

Mittel der Konstanten: Beilage 52.

$$k = 47 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Inv.} = 16,3 \cdot 10^{-12}$$

#### Versuch 5.

Die Hauptmenge der vorbehandelten Hefe wurde durch neuen Zuckerzusatz auf die Inversionsfähigkeit  $\text{Inv.} = 19,2 \cdot 10^{-12}$  gebracht.

Die Hefe wurde nun während weiterer 42 Stunden in der Lösung bei  $24^\circ$  ohne Zuckerzusatz sich selbst überlassen. Zellenzahl:  $1,44 \cdot 10^9$ .

Mittel der Konstanten: Beilage 53.

$$k = 56,5 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Inv.} = 18,8 \cdot 10^{-12}$$

## Zusammenfassung der vorstehenden Ergebnisse:

Nr.	Versuch	k · g Zucker Zellenzahl	
		Inv. abs.	rel.
1	Hefe 4 ohne Vorbehandlung und Waschung	8	100
2	Schnelle Aufgärung ohne vorhergehende Waschung . . . . .	10,0	125
3	Auswaschung mit Leitungswasser . . . . .	9,9	124
4	Vorbehandlung: 18 Std. mit 2% Zucker .	16,3	204

Wie erwähnt, wird also der Saccharasegehalt frischer, lebender Hefe durch mehrstündiges Auswaschen mit Leitungswasser von etwa 10<sup>0</sup> nicht geändert.

Bei der Vorbehandlung ist die Konzentration der Hefe (Menge per Volumen Zuckerlösung) von wesentlichem Einfluß. Bei großer Hefemenge, wie im Versuch 2, wird der anwesende Zucker rasch vergoren, ohne daß eine bedeutendere Saccharasebildung eintritt.

Die im Versuch 1 und 4 gefundene Verdoppelung des Saccharasegehaltes in 18 Stunden entspricht unter den gewählten Versuchsbedingungen einer ziemlich normalen Enzymbildung. In ungewaschener Hefe ist die Vermehrung der Inversionsfähigkeit von der gleichen Größe, wie zahlreiche, später mitzuteilende Versuche gezeigt haben. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Befund von Meisenheimer und Semper<sup>1)</sup>, daß gehopfte und ungehopfte Würze den Saccharasegehalt in gleicher Weise beeinflussen.

Versuch 5 zeigt, daß vorbehandelte Hefe ihren durch die Vorbehandlung erworbenen Saccharasegehalt wenigstens 2 Tage ziemlich unverändert beibehält. Diese Konstanz, bzw. die Rückbildung der Saccharase wird im hiesigen Laboratorium näher studiert.

<sup>1)</sup> Meisenheimer und Semper, Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 380 (1914).

## Beilagen.

Nummer d. Beilage	Minuten	Drehung im 5-cm-Rohr	$k \cdot 10^4$	Bemerkung
----------------------	---------	-------------------------	----------------	-----------

## Abhängigkeit von der Temperatur.

## Versuchsreihe 1

—	0	1,30	—	—
1	10	1,06	64	Ausgangshefe
	20	0,86	62	
	29	0,71	61	
2	10	0,68	189	18°. 40 Std.
	20	0,46	194	
	30	—0,02	201	
3	20	0,39	158	30°. 40 Std.
	30	0,08	171	
4	10	1,07	61	35°. 40 Std.
	20	0,86	62	
	30	0,68	63	
5	6	0,79	253	18°. 40 + 20 Std.
	12	0,38	259	
	18	0,19	256	
6	6	0,65	314	24°. 40 + 20 Std.
	12	0,32	294	
	18	0,05	299	
7	6	0,90	187	30°. 40 + 20 Std.
	12	0,61	180	
	18	0,37	181	

## Versuchsreihe 2

—	0	1,30	—	—
8	10	1,09	55	Ausgangshefe
	20	0,91	54	
	30	0,75	54	
9	6	1,02	125	Ausgangshefe
	12	0,76	133	
	18	0,63	116	

Nummer d. Beilage	Minuten	Drehung im 5-cm-Rohr	$k \cdot 10^4$	Bemerkung
10	10	0,81	142	18°. 24 Std.
	20	0,37	163	
	30	0,03	185	
11	10	0,58	229	23,5°. 24 Std.
	20	0,13	237	
	30	-0,18	266	
12	10	0,52	254	27,5°. 24 Std.
	20	0,04	273	
13	10	0,71	177	32,5°. 24 Std.
	20	0,33	174	
	30	0,02	188	
14	10	0,70	181	24Std. 18° + 24Std. 18°
	20	0,28	188	
	30	0,03	185	
15	10	0,50	263	24Std. 23,5° + 24Std. 18°
	30	-0,18	266	
16	10	0,52	254	24Std. 27,5° + 24Std. 18°
	20	0,05	269	
17	20	0,34	171	24Std. 32,5° + 24Std. 18°
	30	0,04	182	
18	10	0,49	268	72 Std. 23,5°
	20	0,03	278	
	30	-0,19	272	
19	10	0,74	171	72 Std. 32,5°
	20	0,06	178	
Versuchsrufe 3				
—	0	1,33	—	—
20	10	1,20	33	Unvorbehandelte Hefe
	20	1,09	31	
	30	0,97	32	

Nummer d. Beilage	Minuten	Drehung im 5-cm-Rohr	$k \cdot 10^4$	Bemerkung
Serie 1				
21	10	0,90	119	24 Std. 18°
	20	0,57	119	
	30	0,31	121	
22	10	0,83	141	24 Std. 24°
	20	0,42	153	
	30	0,14	157	
23	10	0,70	187	24 Std. 28°
	20	0,26	196	
	30	0,03	204	
24	10	0,89	122	24 Std. 32°
	20	0,56	121	
	30	0,30	123	
Serie 2				
—	0	1,33	—	—
25	10	0,87	128	24 Std. 18° + 24 Std. 18°
	20	0,53	128	
	30	0,24	135	
26	10	0,79	155	24 Std. 24° + 24 Std. 18°
	20	0,37	165	
	30	0,11	164	
27	10	0,72	180	24 Std. 28° + 24 Std. 18°
	20	0,27	193	
	30	— 0,02	201	
28	10	0,93	109	24 Std. 32° + 24 Std. 18°
	20	0,62	109	
	30	0,33	117	
Serie 3				
29	10	0,67	198	24 + 48 Std. 18°
	15	0,41	207	
	20	0,18	221	
30	10	0,48	278	24 + 48 Std. 24°
	15	0,21	282	
	20	0,02	283	

Nummer d. Beilage	Minuten	Drehung im 5-cm-Rohr	$k \cdot 10^4$	Bemerkung
31	10	0,52	260	24 + 48 Std. 28°
	15	0,27	257	
	20	0,06	265	
32	10	0,65	206	24 + 48 Std. 32°
	15	0,45	194	
	20	0,23	205	
Serie 4				
33	10	0,39	321	24 + 48 + 24 Std. 18°
	15	0,09	338	
	20	-0,11	349	
34	10	0,23	410	24 + 48 + 24 Std. 24°
	15	-0,07	436	
	20	-0,24	447	
35	10	0,30	369	24 + 48 + 24 Std. 28°
	15	0,01	372	
	20	-0,18	396	
36	10	0,63	214	24 + 48 + 24 Std. 32°
	15	0,25	265	
	20	-0,01	296	

## Abhängigkeit von der Acidität

## Versuchsreihe 1

—	0	1,33	—	—
37	20	0,98	47	Unvorbehandelte Hefe
	30	0,84	46	
	40	0,71	46	
	50	0,58	47	
38	10	0,90	118	24 Std. bei $p_H = 6,1 - 5,7$
	20	0,56	121	
	30	0,31	121	
39	20	0,85	67	24 Std. bei $p_H = 2,7 - 2,60$
	30	0,65	69	
	40	0,46	72	
40	0	1,32	—	24 Std. bei $p_H = 1,7 - 1,65$
	20	1,27	6,2	
	30	1,24	6,6	
	40	1,23	5,6	
	50	1,20	6,0	

Nummer d. Beilage	Minuten	Drehung im 5-cm-Rohr	$k \cdot 10^4$	Bemerkung
<b>Versuchsreihe 2</b>				
	0	1,33	—	—
41	20	0,94	53	Unvorbehandelte Hefe
	30	0,79	52	
	40	0,65	52	
	50	0,51	53	
42	20	0,83	71	24 Std. bei $p_H = 2,1$
	30	0,62	73	
	40	0,44	74	
43	20	0,50	134	24 Std. bei $p_H = 2,9$
	30	0,23	137	
	40	0,00	146	
44	20	0,39	160	24 Std. bei $p_H = 4,35 - 3,2$
	30	0,10	166	
	40	- 0,16	184	
45	20	0,26	196	24 Std. bei $p_H = 5,3 - 4,3$
	30	- 0,05	211	
	40	- 0,23	219	
46	20	0,28	190	24 Std. bei $p_H = 6,0 - 5,6$
	30	- 0,01	197	
	40	- 0,19	202	
47	20	0,46	143	24 Std. bei $p_H = 7,3 - 6,8$
	30	0,17	150	
	40	- 0,03	153	
48	20	0,47	141	24 Std. bei $p_H = 8,5 - 6,7$
	30	0,20	143	
	40	0,00	146	
<b>Einfluß des Auswaschens</b>				
49	0	1,31	—	Unvorbehandelte Hefe
	15	1,18	22,2	
	31	1,07	20,4	
	62	0,79	24,4	
50	15	1,10	36,6	25°. 18 Std.
	31	0,92	34,9	
	45	0,73	38,4	

Nummer d. Beilage	Minuten	Drehung im 5-cm-Rohr	k · 10 <sup>4</sup>	Bemerkung
51	0	1,30	—	Auswaschung
	30	0,92	35	
	45	0,72	39	
	60	0,63	35	
52	0	1,31	—	24°. 18 Std.
	30	0,85	44	
	45	0,61	49	
	60	0,44	49	
53	0	1,31	—	24°. 18 + 42 Std.
	15	0,99	58	
	30	0,75	55	

### Zusammenfassung.

- Die ältere Literatur über Saccharasebildung wird besprochen und z. T. durch Neuberechnung an die Angaben der neuen Literatur angeschlossen.
- Die Einheit der Inversionsfähigkeit, Inv., lebender Zellen wird festgelegt:

$$\text{Inv.} = \frac{\text{Inversionskonst. } k \times \text{g Rohrucker}}{\text{Zellenzahl}}$$

(per 100 ccm Lösung 8—16 g Rohrucker, 0,4—2 g Hefe).

- Für zwei im hiesigen Laboratorium seit 1911 bzw. 1917 bearbeiteten Hefen wurde die bemerkenswerte Konstanz der Saccharasewirkung bei gleicher Vorbehandlung festgestellt; es ergab sich für

$$\text{Inv.} = 10 \pm 2 \cdot 10^{-12} \quad \text{Unterhefe H}$$

$$3,0 \pm 0,5 \cdot 10^{-12} \quad \text{Oberhefe S B}$$

- Es wird eine Übersicht über die bis jetzt bestimmte Inversionsfähigkeit sieben verschiedener Hefen gegeben.
- Durch eingehende Versuche wird für die Hefe H ein ausgesprochenes Temperaturoptimum der Saccharasebildung zwischen 26° und 30° festgelegt (Fig. 3 S. 234). Von etwa 35 Graden an zeigt unsere Hefe H keine Saccharasebildung mehr.

6. Die Saccharasebildung ist stark von der Acidität der Lösung abhängig. Das Maximum der Enzyymbildung fällt mit dem Optimum der Wirksamkeit der Saccharase recht nahe zusammen. Besonders ist zu bemerken, daß einerseits bei höherer Acidität als  $p_H = 2$  eine zeitliche Zerstörung der Saccharase sich geltend macht und anderseits noch bei  $p_H = 6-7$  eine kräftige Enzyymbildung von etwa 90% der bei optimaler Acidität beobachteten eintritt.
7. Der Saccharasegehalt frischer, lebender Hefe wird durch mehrstündiges Auswaschen mit Leitungswasser von etwa  $10^\circ$  nicht geändert.