

# HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

## PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

E. ABDERHALDEN-Halle, SVANTE ARRHENIUS-Stockholm, G. v. BUNGE-Basel, A. ELLINGER-Frankfurt a. M., G. EMBDEN-Frankfurt a. M., H. EULER-Stockholm, H. FISCHER-Wien, R. GOTTLIEB-Heidelberg, W. v. GULEWITSCH-Moskau, O. HAMMARSTEN-Upsala, S. G. HEDIN-Upsala, V. HENRIQUES-Kopenhagen, G. HOPPE-SEYLER, Kiel, O. KESTNER-Hamburg, F. KNOOP-Freiburg i. Br., L. KREHL-Heidelberg, Wm. KÜSTER-Stuttgart, CARL TH. MÖRNER-Upsala, F. v. MÜLLER-München, J. P. PAWLOW-St. Petersburg, C. A. PEKELHARING-Utrecht, F. PREGL-Graz, W. E. RINGER-Utrecht, E. SALKOWSKI-Berlin, M. SIEGFRIED-Leipzig, S. P. L. SÖRENSEN-Kopenhagen, H. STEUDEL-Berlin, H. THIERFELDER-Tübingen, H. WIELAND-München, R. WILLSTÄTTER-München, A. WINDAUS-Göttingen, E. WINTERSTEIN-Zürich,  
R. v. ZEYNEK-Prag

herausgegeben von

**A. KOSSEL,**

Professor der Physiologie in Heidelberg.

---

**Einhundertundachter Band:**

**Viertes Heft.**

(Ausgegeben am 20. November 1919.)

---

Mit 3 Abbildungen im Text.

---

**BERLIN und LEIPZIG 1919**

**VEREINIGUNG WISSENSCHAFTLICHER VERLEGER**

**WALTER DE GRUYTER & Co.**

vormals G. J. Göschen'sche Verlagsbuchhandlung — J. Guttentag, Verlagsbuchhandlung — Georg Reimer — Karl J. Trübner — Veit & Comp.

# EINHUNDERTUNDACHTER BAND

## VIERTES HEFT.

Inhalt.	Seite
<b>Euler, H. v. und S. Heinze.</b> Über die $p_H$ -Empfindlichkeit der Gärung einer Oberhefe. Mit 3 Figuren im Text . . . . .	165
<b>Balling, Erich.</b> Über Kataraktlinsen des menschlichen Auges .	186
<b>Sieburg Ernst und Erich Harloff.</b> Studien über das Verhalten von Substanzen der Dibenzylreihe (Dibenzyl, Hydrobenzoin, Desoxybenzoin, Benzoin, Benzil, Benzilsäure) im Organismus	195
<b>Sieburg, Ernst und Karl Vietense.</b> Über das biochemische Verhalten von Glykolsäure und Oxalsäure, insbesondere gegen isolierte menschliche Organzellen . . . . .	207
<b>Langecker, Hedwig.</b> Über Deuterokeratose, welche aus Horn durch Laugeneinwirkung gewonnen ist . . . . .	229

---

Für die nächsten Hefte sind Arbeiten eingegangen von:

Olof Hammarsten, S. Edlbacher, R. Fritsch, W. Patzschke.

---

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie erscheint in Bänden von 6 Heften. Preis des Bandes 25 Mark.

Kurze Notizen oder Bemerkungen zu anderen Arbeiten werden in der Regel am Schluß des Heftes und außerhalb der Reihenfolge des Eingangsdatums mitgeteilt. — Bereits in anderen Zeitschriften veröffentlichte Arbeiten, sowie Referate über bereits publizierte Arbeiten werden nicht aufgenommen.

Das Honorar beträgt für den Druckbogen 40 Mark.<sup>o</sup> Von jeder Arbeit werden dem Verfasser 75 Separat-Abdrücke gratis geliefert.

In bezug auf die Rechtschreibung der Fachausdrücke sind bis auf weiteres die Publikationen der Deutschen chemischen Gesellschaft maßgebend. In zweifelhaften Fällen wird der etymologische und internationale Standpunkt vor dem phonetischen bevorzugt.

---

# Über die $p_H$ -Empfindlichkeit der Gärung einer Oberhefe.

Von

H. v. Euler und S. Heintze.

Mit 3 Figuren im Text.

Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 15. September 1919.)

Über die Abhängigkeit der Hefegärung von der Acidität der Zuckerlösungen sind schon sehr zahlreiche Untersuchungen angestellt worden, wie aus Hägglunds bekannter Monographie<sup>1)</sup> ersichtlich ist, auf welche wir bezüglich der älteren Literatur verweisen. Wie aber die Durchsicht der früheren Literatur zeigt, sind die Versuchsbedingungen oft unvollständig angegeben oder wesentliche Faktoren sind nicht berücksichtigt worden, vor allem aber ist bei der überwiegenden Mehrzahl der Beobachtungen die Acidität nicht einwandfrei bestimmt worden, vielmehr hat man die Säuremengen gemessen, welche zur Herstellung der Lösungen verwendet worden sind, ohne zu berücksichtigen, daß diese Säuren zum Teil, oft sogar zum größten Teil, durch andere in der Lösung vorhandenen Stoffe neutralisiert worden sind.

Da die Kenntnis der  $p_H$ -Empfindlichkeit der Hefegärung für die Beurteilung sowohl gärungschemischer Tatsachen als vieler Anpassungserscheinungen notwendig ist, haben wir es unternommen, die Aciditätsempfindlichkeit einer Oberhefe endgültig festzustellen und einer erneuten Diskussion zu unterwerfen.

Die vorliegende Arbeit bildet den Ausgangspunkt für Untersuchungen über die Anpassung von Mikroorganismen an verschiedene Aciditätsgrade<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Hägglund, Hefe und Gärung in ihrer Abhängigkeit von Wasserstoff und Hydroxylionen. Sammlung Ahrens, Stuttgart 1914.

<sup>2)</sup> Siehe hierzu die Untersuchung von Euler und Emberg (Zeitschr.

Wie gleich vorausgeschickt werden soll, muß die experimentelle Lösung unserer Aufgabe in der Festlegung einer Kurve bestehen, deren Koordinaten einerseits durch die  $p_H$ -Werte bzw. die H-Konzentrationen, andererseits durch die Gärfähigkeit bzw. die Anzahl der per Zeiteinheit entwickelten Kubikzentimeter  $CO_2$  gebildet werden.

In zweiter Linie wird dann die gefundene Beziehung an bereits bekannte enzymatische Tatsachen anzuschließen sein.

### Versuchsordnung.

Die Gärung wurde in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle volumetrisch verfolgt, indem die in Erlenmeyerkölbchen entwickelte Kohlensäure durch Kapillarröhren in feingradierte Gasbüretten übergeleitet und daselbst über Quecksilber bei Atmosphärendruck gemessen wurde.

Die Gärungskölbchen befanden sich in einem oder mehreren Thermostaten bei der konstanten Temperatur von  $28^\circ$ . Vor jeder Ablesung wurde die Übersättigung der gärenden Lösung an Kohlensäure durch Schütteln derselben bei Unterdruck aufgehoben.

Das Volumen der gärenden Lösung betrug bei allen Versuchen 150 ccm, die Hefenmenge 2 g, deren Trockengehalt — im Durchschnitt  $30\%$  — für jeden Versuch besonders bestimmt wurde. Die Hefenemulsion wurde so hergestellt, daß 40 ccm einer ca.  $8\%$ igen Natriumphosphatlösung mit 6 g Rohrzucker bzw. Glukose und eventuell mit 50 ccm Hefenextrakt — enthaltend  $0,34\%$  N — versetzt, und hierauf durch Zusatz von Salzsäurelösung annähernd auf die untersuchte Acidität gebracht wurden. Nachdem die Lösung auf 150 ccm verdünnt war, wurden in derselben 2 g der Oberhefe zu einer homogenen Emulsion aufgeschlemmt. In dieser Aufschlemmung wurde nun elektrometrisch  $p_H$  kontrolliert und nötigenfalls durch kleine Zusätze auf den gewünschten Wert eingestellt.

Die elektrometrischen Bestimmungen geschahen im wesentlichen nach der von Sørensen und von Michaelis beschrie-

\*Biol. Bd. 69, S. 349 [1919]), welche durch den Tod des einen Verfassers, Dr. F. Emberg, unterbrochen wurde.

benen Methodik<sup>1)</sup>. Da zwischen  $p_H = 5$  und  $p_H = 7$  die elektrometrischen Messungen an kohlensäurehaltigen Lösungen nicht ganz korrekte Werte liefern, wenn durch einen zu starken Wasserstoffstrom erheblichere Mengen  $CO_2$  aus der Lösung entfernt werden, so wurden die Resultate durch kolorimetrische Messungen nach Sørensens Angaben kontrolliert bzw. ersetzt. In einzelnen Fällen wurden auch einige der von W. M. Clark und Lubs<sup>2)</sup> vorgeschlagenen Indikatoren angewandt.

Die Zellenzählung wurde in einer Rechenkammer (Hämacytometer Bürker) unter dem Mikroskop vorgenommen; die im folgenden angegebenen Zellenzahlen beziehen sich auf die Anzahl Zellen in 36 Quadraten entsprechend einem Gesamtvolumen von  $0,009 \text{ mm}^3$ . Jede mitgeteilte Zahl ist das Mittel aus wenigstens 6 Bestimmungen.

Unsere ganze Untersuchung bezieht sich auf die Oberhefe S B II aus Stockholms Södra Jästfabrik.

Als Zucker haben wir in der Mehrzahl der Versuche Rohrzucker verwendet, bei einigen Versuchen (bei  $p_H = 2,5$  bis  $1,0$ ) Glukose; wie wir uns überzeugt haben, ist auch bei den starken Aciditäten die Inversionsgeschwindigkeit so groß, daß bei Anwendung von Rohrzucker keine wesentlich andern Beziehungen gefunden werden, als bei Anwendung von Glukose. Die Gärungstemperatur war stets  $28^\circ$ .

### Versuche.

#### Versuch 1a. $p_H = 5$ .

Stunden	Mit Hefenwasser			Ohne Hefenwasser	
	ccm $CO_2$	ccm $CO_2$ red.	Zellenzahl	ccm $CO_2$	Zellenzahl
0	—	—	176	—	180
1	130	126	207	55	183
2	379	320	(237)	120	186
3	721	515	(280)	205	191
4	1170	714	326	281	196

<sup>1)</sup> Sørensen, *Ergeb. d. Physiol.* Bd. 12, S. 393 (1912). Siehe auch Hasselbalch, *Bioch. Zeitschr.* Bd. 49, 451; 1913. — Michaelis, *Die Wasserstoffionenkonzentration*, Berlin 1914.

<sup>2)</sup> Clark und Lubs, *Journ. of Bact.* Bd. 2, S. 1 u. 109 (1917).

In ähnlicher Weise wurden bei allen weiteren Bestimmungen die Volumina der entwickelten Kohlensäure auf die gleiche Zellenzahl, und zwar 200, reduziert. Wir geben im folgenden für unsere erste Versuchsreihe die Mittelwerte der in dieser Weise reduzierten Beobachtungszahlen an.

Versuch 1 b.  $p_H = 2,5$ .

Stunden	Mit Hefenwasser	Ohne Hefenwasser
1	84	58
2	205	113
3	332	169
4	465	227
Zuwachs der Zellenzahl in 4 Stunden	0–5 %	0 %

Versuch 1 c.  $p_H = 1,5$ .

Stunden	Mit Hefenwasser	Ohne Hefenwasser
1	40	34
2	61	55
3	80	76
4	96	94
Zuwachs der Zellenzahl in 4 Stunden	5 %	0 %

Versuch 1 d.  $p_H = 1$ .

Stunden	Mit Hefenwasser	Ohne Hefenwasser
1	13	12
2	17	16
3	21	20
4	24	23
Zuwachs der Zellenzahl in 4 Stunden	0 %	0 %

Unsere Messungen der Kohlensäureentwicklung, welche wir bis in die Nähe des Neutralpunktes fortgesetzt haben,

wurden durch einige Versuche, an welchen sich Herr Dr. Svanberg 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 wurden im 300 ccm-Erlenmeyerkolben gemischt:

40 ccm 8%ige Na-Phosphatlösung.  $p_H = 5,3$

50 ccm Hefenwasser (40 g auf 1 Liter)

6 g Glukose.

Die gewünschten pH-Werte wurden durch Zusatz von 2-n. NaOH eingestellt.

3 g frische Hefe in 150 ccm Lösung aufgeschlemmt.

5 Stunden Gärung bei 28,5° im Wasserthermostaten.

	A	B	C	D
Ohne Zusatz von Alkali		2,5 ccm	5,0 ccm	5,6 ccm 2-n. NaOH
pH vor der Gärung:	5,3	6,2	7,2	8,3
		Während der Gärung Zusatz von		
		1,8 ccm	4,1 ccm	6,2 ccm 2-n. NaOH
pH nach d. 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 Stunden	100	105	100	75
nach 5 Stunden	100	103	103	73,5

Mit den angegebenen Versuchen stehen frühere Ergebnisse, welche Frl. N. Florell im Herbst 1918 mit der gleichen Hefe erhalten hat, in guter Übereinstimmung. Wir verzichten darauf, die Zahlen ausführlich anzugeben, und nehmen die Ergebnisse nur in folgende graphische Zusammenstellung unserer Versuche 2—8 auf (Fig. 1 u. 2).

Hinsichtlich des Versuchs 1a bzw. der Kurve 5,0 der Fig. 1 ist zu bemerken, daß dieser Versuch insofern von den übrigen abweicht, als bei demselben eine erhebliche Vermehrung der Hefe stattfand, nämlich, wie in Tab. 1 angegeben, im Verhältnis 176 zu 326. Reduzieren wir den Verlauf der

Kohlensäureentwicklung auf gleiche Zellenzahl, so erhalten wir die in der Fig. 1 punktierte Linie. Diese ist also mit den übrigen Kurven vergleichbar. Eine Betrachtung der sämtlichen

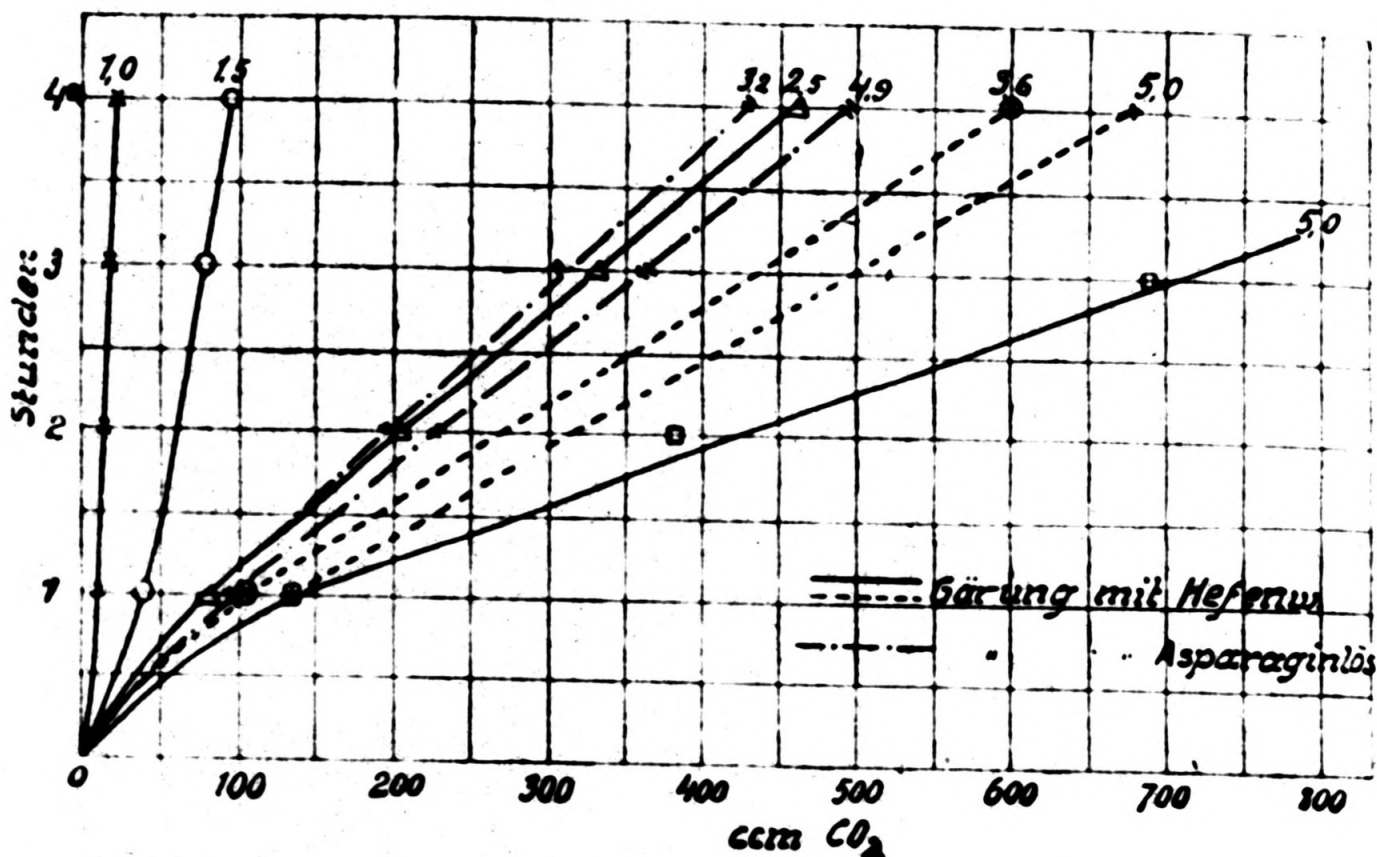


Fig. 1.

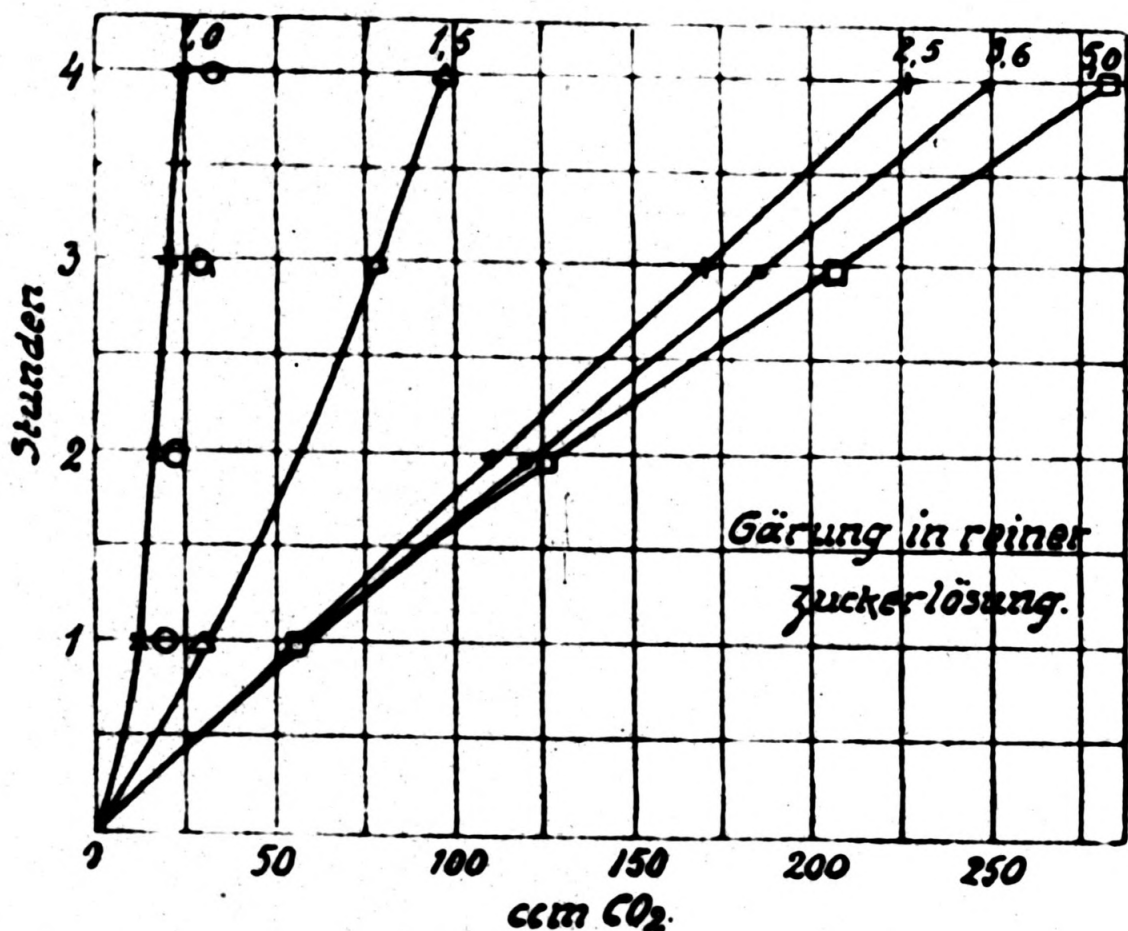


Fig. 2.

Kurven zeigt nun, daß der Verlauf der CO<sub>2</sub>-Entwicklung sich nach etwa 1stündiger Gärung ziemlich angenähert durch gerade Linien darstellen läßt.



Die Geschwindigkeiten können somit, wenn wir von der ersten Stunde der Gärung absehen, recht angenähert durch den Quotienten

$$\frac{\text{ccm CO}_2}{\text{Stunden}}$$

angegeben werden. Dies ist in der folgenden Figur geschehen, in welcher wir die Gärungsgeschwindigkeit als Funktion der Acidität darstellen.

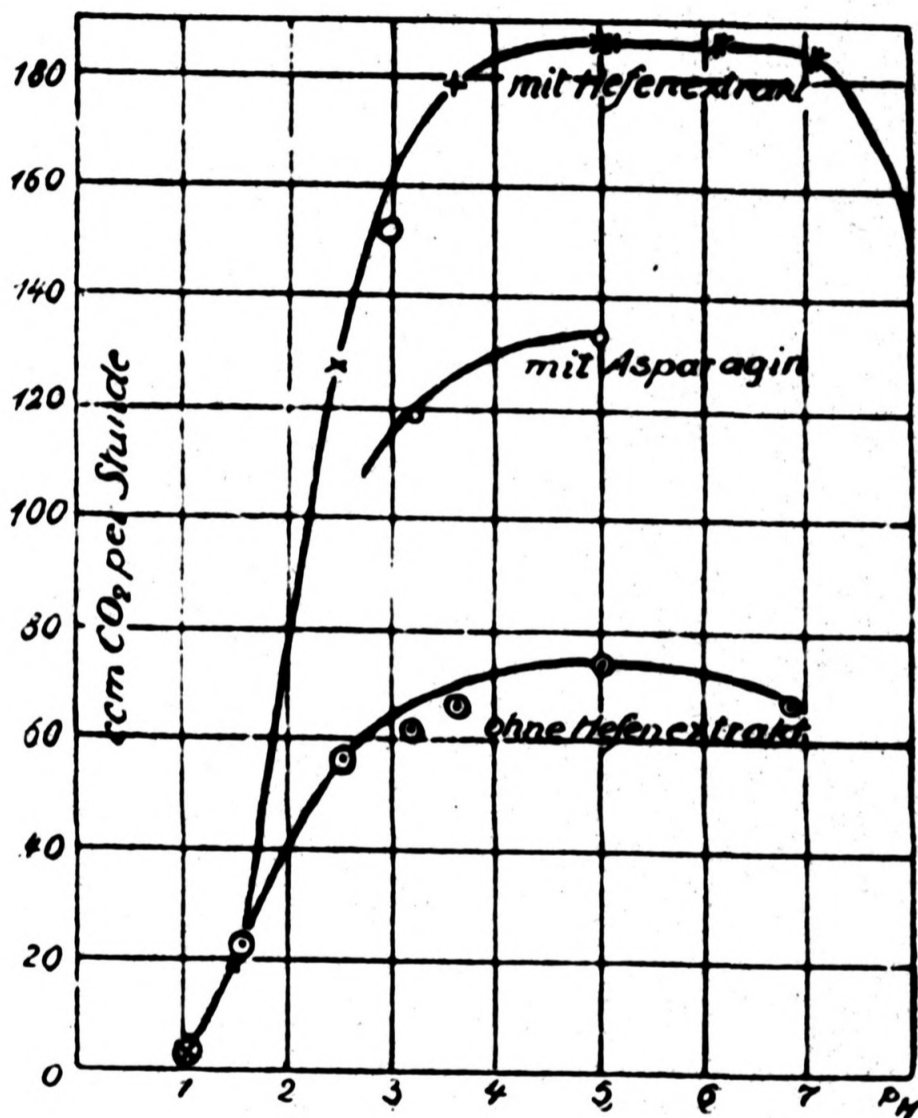


Fig. 3.

Aus der Fig. 3 geht hervor, daß die Einwirkung der Acidität auf den Gärungsverlauf sehr stark von Bestandteilen des Hefenextraktes und von der Stickstoffnahrung beeinflusst wird. Wie nochmals betont werden soll, beziehen sich sämtliche Punkte der beiden Kurven der Fig. 3 auf die gleiche Zellenzahl. Man kann also die gefundene Beziehung so auffassen, daß die Gärungsspaltung durch die stickstoffhaltigen Substanzen des Hefenwassers beschleunigt wird, und daß die so beschleunigte Gärung ein  $p_H$ -Optimum bei ungefähr  $p_H = 5$  besitzt. Von den Bestandteilen des Hefenextraktes sind hier

teils die niederen Eiweißabbauprodukte, teils Aktivatoren von der Art des Hardenschen Co-Enzyms wirksam<sup>1)</sup>).

Es wurde durch besondere Versuche konstatiert, daß die Einwirkung der durch Salzsäure und Phosphorsäure hervorgerufenen Acidität bis  $p_H = 2,5$  während 24 Stunden reversibel ist, d. h. daß die Gärkraft der Hefe durch ein 24stündiges Verweilen in einer Lösung von der oben genannten Zusammensetzung und der Acidität 2,5 nicht geändert wird. Diesbezügliche Versuche sind von Dr. Emberg an Unterhefe und von Frl. N. Florell an Oberhefe ausgeführt worden, in erster Linie, um die Anpassungsfähigkeit der Hefe an höhere Aciditäten zu studieren. Wir führen einen diesbezüglichen Versuch von N. Florell an unserer Oberhefe S B II (Herbst 1918) an.

Die Oberhefe S B II wurde in 4% iger Invertzuckerlösung, welche 2% Natriumphosphat enthielt und auf verschiedene Aciditäten gebracht war, aufgeschlemmt und während 24 Stunden bei 28° gehalten. Dabei kam 1 g Hefe auf 100 ccm Lösung. Die verschiedenen  $p_H$ -Werte waren 2,5, 2,9 und 4,9. Nach 24 Stunden wurde die Hefe aus den verschiedenen Kolben von der Mutterlauge durch Zentrifugieren befreit, und von jeder Probe wurden 0,5 g abgewogen und in eine Lösung gebracht, welche 4 g Invertzucker und 2% Natriumphosphat enthielt und auf die Acidität  $p_H = 5,2$  gebracht war. Die Gärung geschah nun bei der übereinstimmenden Acidität  $p_H = 5,2$ . Diese mehrmals wiederholten Versuche zeigten, daß die Hefe unabhängig, ob sie zuvor bei der Acidität 2,5 oder 5,0 gegoren hatte, nun vollkommen gleiche Gärungsgeschwindigkeit besaß.

Die freie Säure hatte somit keine dauernde Schädigung des Zymasekomplexes des lebenden Protoplasmas hervorgerufen, sondern nur die Gärung vermutlich durch Salzbildung gehemmt.

Wir führen einen Versuch an (Gärung bei  $p_H = 5,2$ ):

#### Versuch 9.

Vorbehandlung bei $p_H$ . .	2,5	2,9	5,2
ccm $CO_2$ nach 2,5 Stunden	28	33	35
„ „ „ 4,5 „	62	67	69

<sup>1)</sup> Siehe hierzu die Mitteilung von Euler, Aktivierung der lebenden Hefe durch Hefenextrakt, Zeitschr. f. techn. Biologie Bd. 7 (1919).

## Versuch 10.

Zur Ergänzung unserer mit Hefenwasser angestellten Versuche haben wir auch die Aciditätsempfindlichkeit bei Gegenwart einer einzigen stickstoffhaltigen Substanz, nämlich Asparagin, feststellen wollen. Die Stickstoffnahrung und damit die Gärungsbedingungen sind damit genauer definiert als bei Zusatz von Hefenwasser, über dessen wirksame Bestandteile wir nicht ausreichende Kenntnisse besitzen.

Die Versuchsbedingungen sind dieselben wie bei den Versuchen mit Hefenwasser, nur wurden statt 50 ccm Hefenwasser nun 50 ccm einer 1,45 %igen Asparaginlösung angewandt, welche nahezu den gleichen N-Gehalt besitzt, wie unser Hefenwasser (0,35 %).

Es wurden wiederum 2 g Hefe (Trockengewicht 27,8 %) in 150 ccm Lösung aufgeschlemmt.

Die Versuche wurden angestellt mit  $p_H = 4,9$  und  $3,2$ , und zwar sowohl mit dem Asparaginzusatz als — um die Vergleichbarkeit dieser Versuche mit den früheren zu garantieren — ohne Stickstoffsubstanz. Dabei ergaben die Gärungen ohne N-Zusatz die gleichen Werte wie bei den früheren Versuchen (siehe Fig. 2), so daß von ihrer Wiedergabe abgesehen werden kann.

Mit Asparagin — die 150 ccm Lösungen enthielten also 0,48 % Asparagin, 4 % Rohrzucker und ca. 2 % Na-Phosphat — wurden folgende Gärungsgeschwindigkeiten gefunden:

Stunden	$p_H = 4,9$		$p_H = 3,2$	
	ccm $CO_2$	Zellenzahl	ccm $CO_2$	Zellenzahl
1	98	153	84	181
2	225	—	201	—
3	366	—	308	—
4	498	200	436	190

In der gleichen Weise wie früher erhalten wir für die Geschwindigkeit, ausgedrückt durch ccm  $CO_2$  per Stunde für:

$p_H = 4,9$   
133

$p_H = 3,2$   
118

Wir haben diese Werte in der Fig. 3 zum Vergleich eingetragen.

Durch besondere Versuche wurde ermittelt, ob das Verhältnis zwischen der Menge verbrauchten Substrates und auftretender Reaktionsprodukte von der Acidität beeinflusst wird. Wir werden auf diese Verhältnisse später näher zurückkommen. Was aber schon hier betont werden soll, ist der Umstand, daß das Verhältnis von verbrauchtem Zucker und auftretender Kohlensäure während der Gärung wesentlich anders ist, wenn die Hefe in Gegenwart von Stickstoffnahrung gärt, als wenn keine Stickstoffnahrung vorhanden ist. Es wurde nämlich im Mittel von 6 Versuchen nach 4stündiger Gärung bei  $p_H = 5,0$  gefunden:

$\frac{\text{g CO}_2 \text{ entw.} \times 100}{\text{g Zucker verbr.}}$	Mit Stickstoffnahrung	Ohne Stickstoffnahrung
	43,5	32,4

Dabei ist der Zucker durch Reduktion, die Kohlensäure volumetrisch bestimmt.

Hierbei sei ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß es sich also hier nicht um die Endvergärung handelt, sondern um einen gewissen Zeitpunkt während der Gärung. In diesem Zeitpunkt ist die Gärung mit Stickstoffnahrung weiter fortgeschritten als die reine Zuckergärung.

Ein weiterer Versuch mag hierzu angeführt werden, bei welchem einerseits die optische Drehung, andererseits das Volumen der entwickelten Kohlensäure ermittelt wurde.

#### Versuch 11.

2 g Hefe (Trockengewicht 27,3 %), 150 ccm 4%ige Glukoselösung bei Gegenwart von 2% Phosphat.  $p_H = 2,7$ .

Stunden	Entwick. $\text{CO}_2$	Entspr. g verg. Zucker	Drehung im 5 cm-Rohr	Entspr. g verg. Zucker
0	—	—	0,92°	—
1	38	0,14	0,89°	0,20
2	90	0,23	0,87°	0,33
3	131	0,48	0,78°	0,90
4	200	0,73	0,74°	1,18

Die dabei auftretende Differenz zwischen verschwundenem Zucker und entwickelter Kohlensäure beträgt rund 7,5 % der totalen anwesenden Zuckermenge und entspricht der Größenordnung nach den von Euler und Johansson<sup>1)</sup> gefundenen analogen Differenzen.

Wenn im vorhergehenden von Acidität gesprochen wurde, und dieselbe durch die Angabe der Konzentration von Wasserstoffionen ausgedrückt worden ist, so galt hierbei die Voraussetzung, daß die Anionen und der nicht dissoziierte Teil der anwesenden Säure hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Gärung vernachlässigt werden können. Dies trifft bei Anwendung von Chlorwasserstoffsäure und — bei geringeren Aciditäten — auch bei Schwefelsäure und Phosphorsäure zu. Bei schwachen organischen Säuren macht sich jedoch der nicht dissoziierte Teil mehr oder weniger stark geltend. Dies gilt in erster Linie von den aliphatischen, einbasischen Fettsäuren. Insbesondere wenn Alkalisalze der betreffenden Säuren als Puffer zugesetzt werden, müssen so große Konzentrationen der Säuren zur Anwendung kommen, um einigermaßen beträchtliche Aciditäten zu erreichen, daß es nicht auffallen kann, wenn sich bei diesen Konzentrationen Giftwirkungen des nicht dissoziierten Anteils geltend machen. Als Beispiel für die Giftwirkung aliphatischer Fettsäuren geben wir folgende Versuche an:

Versuch 12a. Essigsäure.

2 g Hefe (26,4 % Trockengehalt) in 150 ccm Lösung.

Lösung A	Lösung B
0,5 % Na-Acetat 0,07 % Eisessig 4 % Rohrzucker	0,5 % Na-Acetat 3,5 % Eisessig 4 % Rohrzucker
} 150 ccm } $p_H = 5,0$	} 150 ccm } $p_H = 3,2$

Lösung C

2 % Na-Phosphat }  
 4 % Rohrzucker } 150 ccm  $p_H = 4,9$

<sup>1)</sup> Euler und Johansson, Diese Zeitschr. Bd. 76, S. 347 (1912).

Stunden	ccm CO <sub>2</sub>		
	A	B	C
1	80	5	65
2	170	—	134
3	275	8	223
4	400	10	320
8	—	14	—

Eine Bestimmung der Zellenzahl bei den Versuchen A und B ergab nach der Verdünnung 5 : 50, für 9/1000 mm<sup>3</sup>.

	A	B
Vor der Gärung . . . .	115	123
Nach „ „ . . . .	120	130

Bei der Acidität  $p_H = 5$  wurde also mit Eisessig und Natriumacetat eine etwas raschere Vergärung erhalten als mit saurem Phosphat.

#### Versuch 12b. Essigsäure.

Wir haben es erforderlich gehalten, dieses Ergebnis nachzuprüfen. Die Zusammensetzung der Lösungen war hier die gleiche wie in Versuch 12a.

Stunden	ccm CO <sub>2</sub>	
	A: $p_H = 4,9$	C: $p_H = 4,9$
1	52	56
2	150	130
3	262	212
4	377	300

Die Rechnung der Zellenzahl ergab:

	A	C
Vor der Gärung . . . .	131	140
Nach „ „ . . . .	134	139

Das Ergebnis war also in jeder Hinsicht das gleiche wie oben.

#### Versuch 12c. Essigsäure.

Werden größere Mengen Acetat als Puffer angewandt, so werden zur Erreichung einer gewissen Acidität auch größere

Konzentrationen an Essigsäure notwendig, wodurch die Gärung stark gehemmt wird; dies geht aus folgenden Zahlen hervor.

Lösung A		Lösung B
4,2 % Na-Acetat 2,0 % Essigsäure 4 % Rohrzucker	}	4,2 % Na-Acetat 22,0 % Essigsäure 4 % Rohrzucker
150 ccm		150 ccm
$p_H = 4,9$		$p_H = 3,2$
2 g Hefe (Trockengewicht 27,3 %) in 150 ccm.		

Stunden	ccm $CO_2$	
	A	B
1	7	7
2	15	9
4	24	13
22	84	22

Ein Zuwachs der Zellenzahl fand, wie nach dem Ergebnis des Gärungsversuchs zu erwarten war, und auch besonders festgestellt wurde, nicht statt.

#### Versuch 13. Oxalsäure.

Oxalsäure ist in der Literatur vielfach als besonders wirksames Hefengift angegeben worden; dies war der Anlaß, ein paar orientierende Versuche mit dieser Säure anzustellen.

Versuchsbedingungen wie bei Versuch 12c, jedoch mit dem Unterschied, daß weder Phosphat noch ein sonstiger Puffer zugesetzt wurde, um womöglich die Wirkung der Oxalsäure rein zur Erscheinung zu bringen. Dadurch hielt sich die Acidität  $p_H = 5,1$  nicht konstant, sondern stieg auf 2,7.

6 g Rohrzucker in 150 ccm Lösung; darin 2 g Hefe vom Trockengewicht 29,5 %.

Stunden	ccm $CO_2$	
	$p_H = 5,1$ bis 2,7	$p_H = 2,5$
1	112	82
2	260	170
3	395	274
4	565	404

## Bestimmung der Zellenzahl in einem Parallelversuch:

	$p_H = 5,1$	$p_H = 2,5$
Vor der Gärung .	215	219
Nach „ „ .	218	220

Das obige Ergebnis wurde in der Weise kontrolliert, daß von zwei Rohrzuckerlösungen die eine mit saurem Phosphat, die andere mit Oxalsäure auf die Acidität  $p_H = 2,5$  gebracht wurde. Es enthielten somit jede der beiden 4%igen Rohrzuckerlösungen 2 g frische Hefe in 150 ccm; Lösung A war etwa 2%ig in Bezug auf Na-Phosphat, Lösung B enthielt keinen Puffer und wurde mit etwa 1 ccm 4-n.Oxalsäurelösung auf die gewünschte Acidität gebracht. Es wurde bei der übereinstimmenden Acidität  $p_H = 2,5-2,6$  gefunden:

Stunden	ccm $CO_2$	
	Phosphat	Oxalsäure
1	69	70
2	129	128
3	202	199
4	279	270

Die entwickelten  $CO_2$ -Mengen sind also innerhalb der Versuchsfehler die gleichen; eine spezifische Giftwirkung der Oxalsäure findet also — wenigstens in den untersuchten Konzentrationen bis 0,025 norm. — nicht statt.

## Versuch 14. Chromsäure.

Zur Prüfung älterer Angaben über die Giftigkeit der Chromsäure wurde diese untersucht. Die Acidität wurde auf indirektem Weg in folgender Weise festgelegt. In einem Vorversuch wurden 40 ccm einer 8%igen Natriumphosphatlösung mit wäßriger Schwefelsäure von bekannter Normalität auf die  $p_H$ -Werte 5,0 und 2,6 gebracht. Die Lösung wurde auf 150 ccm verdünnt, und nach Einwiegen von 6 g Rohrzucker wurde die Acidität kontrolliert. Zum eigentlichen Versuch wurde eine



Chromsäurelösung von gleichem Titer wie die oben angewandte Schwefelsäure hergestellt und davon zur Hervorrufung der entsprechenden Aciditäten  $p_H = 5$  und  $2,6$  die gleichen Volumina verwendet wie oben. Diese Chromsäurelösung enthielt also die gleiche Menge Phosphat wie die  $H_2SO_4$ -Lös. im Vorversuch. Demgemäß wurden 40 ccm der 8%igen Natriumphosphatlösung mit 2,89 bzw. 2,4 ccm der ca. 5-n. Chromsäurelösung angesäuert und mittels destillierten Wassers auf 150 ccm verdünnt. Hierauf wurden 6 g Rohrzucker und dann 2 g Hefe (Trockengewicht 27,5%) eingewogen.

Die folgende Tabelle gibt die Anzahl ccm der entwickelten Kohlensäure an.

Stunden	ccm $CO_2$	
	$p_H = 5$	$p_H = 2,6$
1	26	24
2	70	67
3	141	134
4	175	154
5	185	163
22	211	184

Bestimmung der Zellenzahl in einem Parallelversuch:

	$p_H = 5$	$p_H = 2,6$
Vor der Gärung	133	121
Nach der Gärung	135	124

#### Versuch 15a. Trockenhefe.

Wird Hefe in dünner Schicht bei Zimmertemperatur getrocknet, so enthalten die Trockenpräparate eine verhältnismäßig sehr große Anzahl der Zellen mit normaler Gärkraft. Eine solche Hefe verhält sich also hinsichtlich der Zuckerspaltung wie frische Hefe. Dies zeigt sich auch in Bezug auf die Aciditätsempfindlichkeit.

Im folgenden Versuch ist die Zusammensetzung der gärenden Lösung genau analog der in Versuch 11, sie ist also 4%ig

in Bezug auf Rohrzucker, etwa 2%ig in Bezug auf Phosphat. In den Versuchen mit Hefenwasser sind 50 ccm Hefenwasser zu 150 ccm Lösung verwendet worden. Die Aciditäten sind  $p_H = 5,0$  und  $3,0$ . 1 g Trockenhefe in 150 ccm Lösung.

Stunden	ccm CO <sub>2</sub>			
	pH = 5,0		pH = 3,0	
	mit Hefenw.	ohne Hefenw.	mit Hefenw.	ohne Hefenw.
1	20	10	15	10
3	110	55	57	26
4	206	97	99	49
5	337	142	157	74

Zur Zellenzählung wurde wie immer die Hefenemulsion im Verhältnis 1 : 10 verdünnt; die Zahlen geben die Anzahl Zellen per 0,009 mm<sup>3</sup> an.

	pH = 5,0	
	mit Hefenw.	ohne Hefenw.
Vor der Gärung	229	216
Nach der Gärung	230	215

#### Versuch 15b. Alkoholdauerhefe.

Behandelt man frische Hefe mit absolutem Alkohol in der von Buchner zur Herstellung von Dauerhefe angegebenen Weise, so erhält man bekanntlich ein Präparat, welches zwar keine Fortpflanzungsfähigkeit, aber noch Gärkraft besitzt. Die Gärkraft ist, wie der eine von uns früher betont hat, außerordentlich klein im Vergleich zu derjenigen der frischen Zellen, was so zu deuten ist, daß nur ein sehr kleiner Teil der Hefegärung durch freie Zymase hervorgerufen wird, während der größte Teil der Gärung durch das Protoplasma der Hefe vermittelt wird.

In solchen Dauerhefen haben wir also, ebenso wie im Hefenpreßsaft, die eigentliche Zymasegärung vor uns. Es war daher von Interesse, die Aciditätsempfindlichkeit dieser Dauerhefe kennen zu lernen, und wir teilen hier einen Versuch mit.

Zusammensetzung der Lösungen wie im Versuch 15a. Auf 150 ccm Lösung nun 10 g Dauerhefe.

Stunden	ccm $CO_2$			
	$p_H = 5,1$		$p_H = 2,6$	
	mit Hefenw.	ohne Hefenw.	mit Hefenw.	ohne Hefenw.
2	14	6	—	—
7	19	11	5	5
22	100	61	74	55

Die allmähliche Zunahme der Gärkraft solcher Dauerhefen, wie die hier untersuchte, ist noch nicht aufgeklärt. Aus verschiedenen Gründen, besonders wegen der sehr geringen Mengen  $CO_2$ , welche durch 10 g Hefe entwickelt werden und teilweise durch Selbstgärung entstehen, sind hier die Versuchsfehler sehr groß, so daß einstweilen nur gesagt werden kann, daß die Kohlensäureentwicklung auch durch Alkoholdauerhefe bei  $p_H = 2,6$  bedeutend geringer ist als bei normaler Acidität.

### Übersicht.

Unsere Aufgabe war die Festlegung der Aciditätsfunktion auf die Gärung einer Hefe. Es mußte sich hier also um die Beziehung zwischen der Konzentration der in den Lösungen tatsächlich vorhandenen H-Ionen und der Gärungsgeschwindigkeit handeln.

Um spezifische Nebenwirkungen auszuschließen und andererseits die Acidität während des Gärungsverlaufes konstant halten zu können, haben wir mit Lösungen gearbeitet, welche rund 1,5%  $PO_4$  als Puffer enthielten, und haben die gewünschte Acidität durch Chlorwasserstoffsäure hergestellt. Bis zur Konzentration 0,01 n. kann der Einfluß der Chlorionen vollkommen vernachlässigt werden.

Bei den schwachen organischen Säuren ist die Konzentration der nicht dissoziierten Moleküle so groß im Vergleich zur Konzentration der Ionen, ganz besonders, wenn noch Neutralsalz der betreffenden Säure als Puffer zugesetzt wird, daß erstere einen wesentlichen Anteil an der Gesamtwirkung der Säure besitzen. Zur Feststellung der Aciditätsfunktion der Gärung sind organische Säuren deswegen sicher nicht geeignet.

Die Messung des teils aktivierenden, teils hemmenden Einflusses der nichtdissoziierten Säuremoleküle lag aber nicht im Bereich unserer Aufgabe; dort handelt es sich um Einflüsse, für welche wenigstens vorläufig die Bezeichnung Giftwirkung geeignet sein mag.

Eine Durchsicht der älteren Literatur zeigt, wie einleitungsweise bereits erwähnt, daß es früher bei den meisten Versuchen an der genauen Festlegung der Bedingungen, besonders der  $p_H$ -Werte gefehlt hat, und daß sich dieselben auch nachträglich schwer aus den angegebenen Versuchsdaten berechnen lassen<sup>1)</sup>. Abgesehen davon war die Art der Bearbeitung des Zahlenmaterials im allgemeinen nicht zweckentsprechend und hat deswegen zu einer endgültigen Klärung der Verhältnisse nicht geführt.

Zunächst wurden die teilweise zu praktischen Zwecken ermittelten Versuchsdaten rein empirisch behandelt, die untersuchten Säuren nach anorganischen und organischen oder giftigen und ungiftigen getrennt. Dies ist z. B. bei den eingehenden und in technischer Hinsicht grundlegenden Untersuchungen von Maerker<sup>2)</sup>, Hayduck<sup>3)</sup>, Lange<sup>4)</sup> und Henneberg<sup>5)</sup> der Fall. Gelegentlich, auffallenderweise sogar in neueren Arbeiten, hat man versucht, die Wirkung der Säuren mit ihrer Neutralisationswärme oder mit einer mehr oder weniger willkürlichen Schätzung ihrer „Stärke“ in Beziehung zu setzen. Diese Arbeiten enthalten zum Teil viele wertvolle Einzelbeobachtungen, aber einen exakten Beitrag zu unserem Thema liefern sie nicht. Unter den größeren Untersuchungen sind zu nennen diejenigen von Werenskiöld<sup>6)</sup>, Juslin<sup>7)</sup>,

<sup>1)</sup> Dabei ist in vielen Fällen nicht unterschieden worden zwischen dem Einfluß der Säuren auf die Gärung, auf das Wachstum und auf die Reinhaltung der Hefe.

<sup>2)</sup> Maerker, Zeitschr. f. Spirit. Ind. 114 (1881).

<sup>3)</sup> Hayduck, Zeitschr. f. Spirit. Ind. 341 (1881).

<sup>4)</sup> Lange, Zeitschr. f. Spirit. Ind. 175 (1899). — Wochenschr. f. Brau. Nr. 32–39 (1907).

<sup>5)</sup> Henneberg, Wochenschr. f. Brau. 40–44 (1906); (1908).

<sup>6)</sup> Werenskiöld, Zeitschr. f. Spirit. Ind. 114 (1881).

<sup>7)</sup> Juslin, Zeitschr. f. Spirit. Ind. 219 (1886).

H. Schulz<sup>1)</sup>, Biernacki<sup>2)</sup>, Wehmer<sup>3)</sup>, Fernbach<sup>4)</sup>, Effront<sup>5)</sup>, Bokorny<sup>6)</sup>, Heinzelmann<sup>7)</sup>, Bücheler<sup>8)</sup>, Moufang<sup>9)</sup>, Rosenblatt und Rosenband<sup>10)</sup>.

Erst verhältnismäßig spät hat man versucht, die Dissoziationstheorie als theoretische Grundlage für die Aciditätsempfindlichkeit der Hefegärung zu benützen. Hier sind die Arbeiten von Bial<sup>11)</sup> und von Johannessohn<sup>12)</sup> zu nennen.

Johannessohn kommt in seiner verdienstlichen Arbeit zu dem Ergebnis, daß nicht die Ionen, sondern das nicht dissoziierte Molekül die Hauptrolle spielen, was für die von ihm untersuchten organischen Säuren durchaus richtig ist, nicht aber für die starken Mineralsäuren<sup>13)</sup> HCl und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei den für die Gärung hauptsächlich in Betracht kommenden pH-Werten 2—7.

Auch die Berechnung von Bial hat zu einem allgemeineren positiven Ergebnis kaum geführt. Abgesehen davon, daß Bial über seine Hefe gar keine näheren Angaben macht, während doch die Säureempfindlichkeit der verschiedenen Rassen und Stämme stark variiert, muß der Versuch, eine H-Konzentration festzustellen, bei welcher die Gärung unterdrückt wird, als mißglückt angesehen werden.

<sup>1)</sup> H. Schulz, Pflüg. Arch. 42, 517 (1888).

<sup>2)</sup> Biernacki, Zeitschr. f. d. ges. Brauw. 14 (1891).

<sup>3)</sup> Wehmer, Chem. Ztg. 21, 73 (1897) und 23, 163 (1899). — Zeitschr. f. Spirit. Ind. 14—16 (1901).

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

<sup>5)</sup> Effront, Bull. Soc. Chim. (3) 5, 476 u. 705 (1891). — C. R. 117, 559 (1893).

<sup>6)</sup> Bokorny, Chem. Ztg. Nr. 34 (1901). — Zentralbl. f. Bakt. (2) 8, 508 (1902) und 10, 257 (1903).

<sup>7)</sup> Heinzelmann, Zeitschr. f. Spirit. Ind. 327 (1897).

<sup>8)</sup> Bücheler, Zeitschr. f. Spirit. Ind. 98 (1901).

<sup>9)</sup> Moufang, Wochenschr. f. Brau. Nr. 37—38 (1911).

<sup>10)</sup> Rosenblatt u. Rosenband, C. R. 149, 309 (1909). — Bull. Soc. Chim. 13, 924 (1913).

<sup>11)</sup> Bial, Zeitschr. f. physikal. Chem. Bd. 40, S. 513 (1902).

<sup>12)</sup> Johannessohn, Biochem. Zeitschr. Bd. 47, S. 97 (1912).

<sup>13)</sup> Wie Stevens erwiesen hat, besitzen Cl- und SO<sub>4</sub>-Ionen keine giftigen Eigenschaften (Bot. Gaz. Bd. 26, S. 377 [1898]).

Demgegenüber bedeutet die Bearbeitung des Themas durch Hägglund einen zweifellosen Fortschritt. Hägglund versucht nicht eine Konzentration der totalen Vergiftung festzustellen, sondern berechnet, bei welcher H<sup>+</sup>-Konzentration die Gärungsgeschwindigkeit mit 25% abnimmt. Er findet (bei einer Hefemenge von 1 g) diesen Wert  $5 \cdot 10^{-8}$  g-Ion per Liter, also rund  $p_H = 2,3$ . Aus der Fig. 3 entnehmen wir für den gleichen  $p_H$ -Wert eine Abnahme von 29% statt 25%, was in Anbetracht, daß Hägglund seinen Mittelwert aus Messungen mit verschiedenen Hefen erhalten hat, als eine befriedigende Übereinstimmung bezeichnet werden kann. Ferner ist sich Hägglund vollkommen im klaren darüber, daß es nicht ausreichend ist, die Menge der zugesetzten Säure zu kennen. „Worauf es ankommt, ist die Konzentration der freien H-Ionen in der Lösung.“ Hat man es mit reinwäßrigen Lösungen zu tun, so kann diese H<sup>+</sup>-Konzentration berechnet werden . . . „In jedem andern Fall ist der einzig richtige Weg eine direkte Bestimmung der freien H-Ionen auf physikalisch-chemischer Grundlage. Die Methoden sind in neuerer Zeit sehr gründlich durchgearbeitet worden, besonders durch Sørensen . . .“

Auch finden wir bei Hägglund zuerst eine kritische Diskussion über die Säurewirkung, einerseits auf die Enzyme, andererseits auf das Plasma der Hefezellen, sowie über die Acidität innerhalb der Zellen als die eigentlich maßgebende Größe. Andererseits waren die von Hägglund beigebrachten Aciditätsmessungen, besonders auf der alkalischen Seite des Optimums, nicht ausreichend, und eine in Aussicht genommene Ergänzung seiner Versuche kam nicht zur Ausführung. Dieselbe ist mit seinem Einverständnis nun hier vorgenommen worden.

Endlich sind die schönen Versuche von Lüers<sup>1)</sup> und die neueren Arbeiten von Boas<sup>2)</sup> zu erwähnen, welche mit

<sup>1)</sup> Lüers, Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Bd. 37, S. 79 (1914).

<sup>2)</sup> Boas u. Leberle, Biochem. Zeitschr. Bd. 90, S. 78 (1918). Die in der genannten Arbeit von Boas gemachte Angabe, daß Euler die von Lüers gemessenen H<sup>+</sup>-Konzentrationen als Optimalwerte angesehen habe, beruht, wie Herr Boas uns mitzuteilen die Freundlichkeit hatte, auf einem Irrtum. (Vgl. hierzu auch Biochem. Zeitschr. Bd. 96 [1919].)

der modernen Methodik die Eigensäuerung mehrerer Hefenmaßen.

In der vorliegenden Arbeit ist nun zum erstenmal die ganze Aciditäts-Empfindlichkeitskurve einer Hefe festgelegt worden, und zwar ist die angegebene Kurve für die Gärungsgeschwindigkeit einer Oberhefe gültig.

Zur vollständigen Erledigung der behandelten Aufgabe stehen noch entsprechende Untersuchungen an andern Heferassen unter weiterer Variation der Versuchsbedingungen aus. Immerhin kann auf Grund der hier exakt festgelegten Kurve eine große Zahl älterer Angaben, welche sich im Lichte der modernen wissenschaftlichen Methoden teils wegen mangelnder Präzisierung der Versuchsbedingungen als inhaltlos, teils als unrichtig erwiesen haben, schon jetzt aus der Literatur gestrichen werden.