

Über die gleichzeitige Veränderung des Gehaltes an Glykogen, an Stickstoff und an Enzymen in der lebenden Hefe.

Von
Sixten Kullberg.

Mit sechs Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)
(Der Redaktion zugegangen am 5. Juli 1914.)

Vor einiger Zeit sind ein paar Mitteilungen von H. v. Euler¹⁾ über die Rolle des Glykogens bei der Gärung durch lebende Hefe erschienen. Er weist auf einige Umstände hin, die für die bis jetzt wenig beachtete Grüßsche Hypothese,²⁾ daß bei der alkoholischen Gärung in der Hefe der Zucker zunächst in Glykogen verwandelt wird, zu sprechen scheinen. Wenn die Grüßsche Hypothese zutrifft, wird es auch wahrscheinlich, daß die Zwischenprodukte, welche man auf Grund der Differenz ($\Delta - C$)³⁾ zwischen dem verschwundenen Zucker und der auftretenden Kohlensäure annehmen muß, Stoffe sind, die zwischen den Hexosen und dem Glykogen liegen.

Im Anfang einer Untersuchung über diese Kohlenhydrate habe ich mir vorgenommen, die gleichzeitige Veränderung des Gehaltes der Hefe an Glykogen, an Stickstoff und auch an Enzymen etwas näher zu studieren. Es ist bekannt, daß stickstoffreiche, gärkräftige Hefen glykogenärmer sind als die, welche weniger Stickstoff halten. Diese Tatsache ist in Mitteilungen von Schönfeld und Hirt⁴⁾ und Schönfeld und Künzel⁵⁾

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 337 (1914), und Bd. 90, S. 355 (1914). — Vgl. hierzu Harden und Young, Biochem. Journ., Bd. 7, S. 630 (1913).

²⁾ Zeitschr. f. d. ges. Brauw., Bd. 27 (1904).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 347 (1912). — Zeitschr. f. Gärungsphysiol., Bd. 1, S. 203 (1912). — Ebenda, Bd. 3, S. 235 (1913).

⁴⁾ Wochenschrift für Brauerei, Bd. 29, S. 174 (1912).

⁵⁾ Wochenschrift für Brauerei, Bd. 31, S. 9 (1914).

hervorgehoben, welche eine Reihe von Hefen ungleicher Rasse auf Glykogen und Eiweiß untersucht haben und von einer umgekehrten Beziehung zwischen diesen beiden Stoffen sprechen. Sie zeigen, daß die Glykogenbildung in der Hefe vor allem von der Rasse der Hefe abhängig ist.

Von einer quantitativen (inversen) Proportionalität kann aber wohl nach den Resultaten Schönfelds und seiner Mitarbeiter nicht die Rede sein, wie folgende Tabelle zeigt:

Rasse	Eiweißgehalt % der Trockensubstanz	Glykogengehalt % der Trockensubstanz	K. Eiweißgehalt × Glykogengehalt
Hefe L. . .	64	17	1088
Hefe K. . .	60	30	1800
Hefe D. . .	57	32	1824

Man sieht aus den von mir berechneten Werten K (Eiweißgehalt × Glykogengehalt), daß hier keine Proportionalität zutrifft, da K eine Konstante sein müßte.

Daß sich Glykogen und andere höhere Kohlehydrate in der Hefe bilden, ist ja eine altbekannte Tatsache, und ebenso daß der Gehalt an Glykogen großen Schwankungen (etwa 5% bis 35%) unterworfen ist. Viele Forscher sind damit beschäftigt gewesen, diese Tatsachen näher aufzuklären. Wir können nennen Errera¹⁾ und Laurent,²⁾ der eine Zuckerlösung von 10—15% als die geeignetste Nahrung für reichliche Glykogenbildung gefunden hat. Er fand im Höchsthalle 32,6% Glykogen. Weiter bemerken wir Will³⁾ und Meißner,⁴⁾ die das Glykogen als Reservestoff ansehen. Kaiser und Boulanger⁵⁾ haben die Glykogenbildung untersucht, wenn die Hefe unter Einwirkung von Wein-, Äpfel- und Citronensäure stand. Sie haben einen sehr wechselnden Glykogengehalt er-

¹⁾ Comptes rendus, 1885, S. 253.

²⁾ A. Koch, Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Gärungsorganismen, 1890, S. 54.

³⁾ Allgemeine Brauer- und Hopfenzeitung, 1892, Nr. 67.

⁴⁾ Zentralblatt für Bakteriologie, 1900, II, Bd. 6, S. 517.

⁵⁾ Zentralblatt für Bakteriologie, Abt. 2, Bd. 5, S. 532.

halten, je nachdem Zuckergehalt, Temperatur, Heferasse, Acidität, Säureart etc. variiert wurden. Als günstig für die Glykogenbildung haben sie hohen Zucker- oder niedrigen Säuregehalt gefunden.

Henneberg¹⁾ hat eine eingehendere Glykogenuntersuchung vorgenommen. Wie früher Will weist er darauf hin, daß das Glykogen beim Lagern und Wässern der Hefe verschwindet, schneller in der Wärme als in der Kälte. In abgetöteter Hefe dagegen ist das Glykogen lange haltbar. Großer Zuckergehalt der Nährlösung bewirkt die Glykogenbildung; wenn der Zucker durch die Gärung zu einem gewissen Grade abgenommen hat, nimmt auch das Glykogen ab. Die Glykogenbildung beruht auch auf der Heferasse und auf den auf die Gärung einwirkenden Faktoren. Henneberg ist der Ansicht, daß das Glykogen nicht als Reservestoff betrachtet werden kann, wohl aber als ein Zeichen reichlicher Anwesenheit von Zucker.

Weiter hat Kohl²⁾ Versuche über Glykogen und Glykogenbildung gemacht. Er meint, daß Glykogen nicht nur Reservestoff sein kann. Es reguliert den Zuckerzufluß in die Zelle und ist als Zwischenglied bei der Alkoholbildung zu betrachten.

Schließlich will ich eine Untersuchung von Pavy und Bywaters³⁾ über Glykogenbildung durch Hefe nennen. Sie untersuchen quantitativ das von den Hefezellen gebildete Glykogen. Sie haben in gewöhnlicher Handelshefe ungefähr 5% Glykogen (= 25% der Trockensubstanz) gefunden. Mit verdünnten Zuckerlösungen als Kulturflüssigkeit erhielten sie nach 2—3 Stunden eine Verdoppelung bis Verdreifachung des primären Glykogengehaltes. — Bei ihrer Hefe ist der relativ hohe Glykogengehalt bemerkenswert. Weiter muß ich schon jetzt betonen, daß die Ergebnisse dieser Autoren durch meine unten beschriebenen Versuche nicht bestätigt wurden. Wie Euler

¹⁾ Wochenschrift für Brauerei, 1902, S. 651.

²⁾ Wochenschrift für Brauerei, 1907, S. 206. Ref. aus Ber. der Deutsch. Bot. Ges., Heft 2, 1907.

³⁾ Chem. Zentralbl., 1908, I, S. 544. Ref. aus Journ. of Physiol., Bd. 36, S. 149—63 (1907).

in den oben genannten Mitteilungen. habe auch ich im Anfang der Gärung eine starke Verminderung des Glykogengehaltes gefunden.

Außer den oben genannten Arbeiten von Schönfeld und seinen Mitarbeitern gibt es meines Wissens keine Untersuchung, die den Gehalt der Hefezellen an Glykogen mit dem Stickstoffgehalt zusammenstellt. Diese Forscher haben, wie gesagt, eine Reihe von Hefen ungleicher Rasse auf Glykogen und Stickstoff hin untersucht. In der vorliegenden Untersuchung habe ich bei einer und derselben Hefe durch geeignete Vorbehandlung den Glykogengehalt variiert und in Zusammenhang damit die Variationen des Stickstoffs und (in einigen Fällen) der Enzymwirkung (Invertase) gemessen.

Versuchsordnung.

Die Versuche wurden mit untergärer Hefe von der hiesigen Hamburger-Brauerei angestellt. Die Hefe wurde gereinigt durch Waschen bis zum Klarwerden der obenstehenden Flüssigkeit und dann abgepreßt.

Zur Vorbehandlung der Hefe wurden folgende Nährlösungen angewandt, welche natürlich immer durch Kochen sterilisiert waren.

Lösung 1	$\left\{ \begin{array}{l} 0,25 \text{ g MgSO}_4 \\ 4 \text{ } \triangleright \text{ (H}_4\text{N)}_2\text{SO}_4 \\ 5 \text{ } \triangleright \text{ KH}_2\text{PO}_4 \\ 20 \text{ } \triangleright \text{ Rohrzucker} \end{array} \right\} \text{ im Liter}$	Lösung 1a	$\left\{ \begin{array}{l} 0,25 \text{ g MgSO}_4 \\ 4 \text{ } \triangleright \text{ (H}_4\text{N)}_2\text{SO}_4 \\ 5 \text{ } \triangleright \text{ KH}_2\text{PO}_4 \\ 20 \text{ } \triangleright \text{ Glykose} \end{array} \right\} \text{ im Liter}$
Lösung 2	$\left\{ \begin{array}{l} 0,25 \text{ g MgSO}_4 \\ 5 \text{ } \triangleright \text{ KH}_2\text{PO}_4 \\ 20 \text{ } \triangleright \text{ Rohrzucker} \end{array} \right\} \text{ im Liter}$	Lösung 3	$\left\{ \begin{array}{l} 0,25 \text{ g MgSO}_4 \\ 4 \text{ } \triangleright \text{ (H}_4\text{N)}_2\text{SO}_4 \\ 5 \text{ } \triangleright \text{ KH}_2\text{PO}_4 \\ 40 \text{ } \triangleright \text{ Rohrzucker} \end{array} \right\} \text{ im Liter}$

In einen Liter Nährlösung wurden 10 g Hefe eingimpft. Die Vorbehandlung geschah immer bei einer Temperatur von 19° C. Nach einer gewissen Anzahl Stunden wurde die Vorbehandlung dadurch abgebrochen, daß die Nährlösung von der vorbehandelten Hefe so weit wie möglich abdekantiert und dann so schnell wie möglich durch ein gehärtetes Faltenfilter abfiltriert wurde. Die Hefe wurde dann einmal mit kaltem

Wasser gewaschen und einige Minuten auf Ton getrocknet. Sowohl das Einimpfen wie die Filtration und Trocknung der Hefe geschah in einem abgekühlten (etwa 8° C.) und mit Thymol¹⁾ desinfizierten Abzug. Die so erhaltene Hefe wurde entweder aufs neue in frische Nährlösung eingimpft oder analysiert.

Um im folgenden anzudeuten, daß die Hefe zuerst eine Anzahl Stunden in einer Nährlösung a und sodann nach Überimpfung eine Anzahl Stunden in einer neuen Lösung b vorbehandelt ist, wird die Stundenanzahl in jeder neuen Lösung zu der früheren durch + hinzugefügt. Daß eine Hefe z. B. 24 + 17 + 20 Stunden vorbehandelt worden ist, bedeutet also, daß sie zweimal überimpft worden ist.

Die analytischen Bestimmungen waren: Feststellung des Gehalts an Trockensubstanz, Glykogen und Stickstoff und in einigen Serien der Inversionskonstanten. Der Gehalt an Trockensubstanz wurde durch Entwässern eines Anteils der Hefe bei 90° bestimmt. Die Glykogenbestimmung wurde nach der von Schönfeld und Künzel²⁾ modifizierten Pflügerschen Methode ausgeführt. Zu bemerken ist, daß ich nur ca. 5 g Hefe zur Glykogenanalyse verwendete. Die durch Hydrolyse gebildete Glukose wurde immer nach Bertrand bestimmt. Der Stickstoffgehalt wurde nach der Methode von Kjeldahl ermittelt.

Wenn schließlich die Invertase-Tätigkeit bestimmt wurde, geschah es folgendermaßen: 0,25 g Hefe wurden in einer Mischung von 10 ccm 1%iger NaH_2PO_4 -Lösung und 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung aufgeschlemmt. Die Phosphatanwesenheit bewirkt, daß bei den Versuchen eine sehr nahezu

¹⁾ Thymol in Alkohollösung wurde eine halbe Stunde vor dem Filtrieren oder Impfen mittels eines Refraicheurs gespritzt.

²⁾ Wochenschrift für Brauerei, Bd. 31, S. 9 (1914). Hier werden allerdings nach Salkowski (Diese Zeitschr. Bd. 92, S. 75; 1914) andere höhere Kohlehydrate mitbestimmt. Für die vorliegende Frage kommt dies nicht in Betracht, denn, wie Salkowski selbst sagt, ob man den betr. Körper Glykogen nennt oder Hefenglykogen — um einen gewissen Unterschied vom Glykogen des Tierkörpers zuzugeben —, ist im Grunde gleichgültig.

gleiche Konzentration der H-Ionen erhalten wird. Die Reaktion wurde mit 10 ccm 5%iger Na_2CO_3 -Lösung nach gewissen Zeiten abgebrochen, die Hefe wurde abfiltriert und die Lösung im 1 dm-Rohr polarisiert. Die Inversion hat immer bei 19° stattgefunden. In den Tabellen sind die Inversionszeiten in Minuten angegeben, weiter die beobachteten Drehungen und die Reaktionskonstanten $k = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{a}{a-x}$. Die Konstanten sind mit Briggschen Logarithmen berechnet.

Versuchsreihe 1.

Durch die ersten Versuche sollte eine Orientierung über das Verhältnis zwischen dem Stickstoff- und Glykogengehalt gewonnen werden. Schönfeld und seine Mitarbeiter glaubten ja, wie oben erwähnt, eine inverse Beziehung zwischen diesen Größen gefunden zu haben.

Tabelle 1.

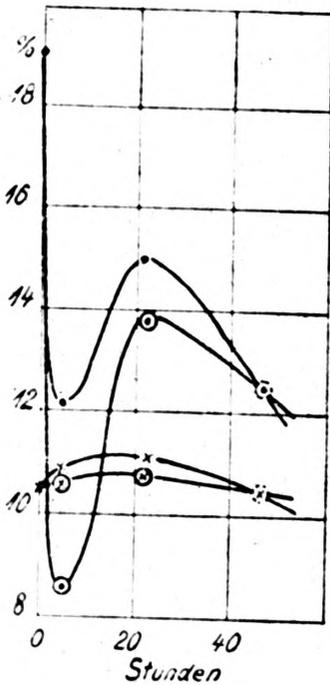
Vorbehandlung Stunden	Stickstoffgehalt (% der Trockensubstanz)		Glykogengehalt (% der Trockensubstanz)	
	Lösung 1 (Rohrzucker)	Lösung 1a (Glykose)	Lösung 1 (Rohrzucker)	Lösung 1a (Glykose)
0	10,44		18,92	
5	10,96	10,52	12,11	8,46
22	11,14	10,82	14,99	13,84
47	10,52	10,50	12,49	12,53

Diese Tabelle ist graphisch in Fig. 1 dargestellt.

Wie aus Tab. 1 und Fig. 1 hervorgeht, sind parallele Versuche teils mit Glukose, teils mit Rohrzucker in der Nährlösung angestellt. Die Variationen durch Vorbehandlung in Glukoselösung sind betreffs Glykogens größer, betreffs Stickstoffs geringer als in der Lösung mit Rohrzucker. Nach 47 Stunden ist der Gehalt sowohl an Glykogen wie an Stickstoff in den beiden parallelen Versuchen gleich geworden. Von einer inversen Proportionalität des Stickstoffs- und Glykogen-

gehaltenes kann keine Rede sein. Die Schwankungen des Glykogens sind viel größer als die des Stickstoffs.

Fig 1.



- × Stickstoff (Lösung 1).
- ⊗ " " (" " 1a).
- Glykogen (" " 1).
- ⊙ " " (" " 1a).

Die Kurven sind übrigens typisch für die Variationen, besonders des Glykogengehaltes und auch des Stickstoffgehaltes. Sie werden in der ersten Phase der späteren Versuchsreihen 4 und 6 wiedergefunden. Betreffs des ersten Teils der Glykogenkurve (etwa bis 3 St.) ist die Übereinstimmung gut mit den dieses Gebiet umfassenden, obengenannten Untersuchungen Eulers. Auch betreffs der Stickstoffvariation gibt es eine gewisse Übereinstimmung mit einem früheren Versuch von Euler und Meyer.¹⁾ Zu bemerken ist, daß bei dem Versuch dieser Autoren 5 g abgepreßte Hefe in 250 ccm Nährlösung aufgeschlemmt wurden, während bei meinen Versuchen nur die halbe Hefemenge auf dasselbe Volumen Nährlösung kam.

Versuchsreihe 2.

Die Versuche dieser Reihe wurden angestellt, um einige Anhaltspunkte zu erhalten über die Variationen des Gehalts der Hefe an Glykogen, Stickstoff und Invertase, wenn die Hefe wiederholt in neue Nährlösung übergeimpft wird.

Die Vorbehandlung wurde in Lösung 1 vorgenommen. Die ersten Tabellen zeigen die Invertasebestimmungen, und dann sind in Tab. 2 und Fig. 2 die Resultate zusammengestellt. Dabei sind die Mittelwerte der Inversionskonstanten auf einen gemeinsamen Trockengehalt von 30% reduziert worden.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 284 (1912).

Invertasetabelle der Reihe 2.

t Min.	Ohne Vorbehandlung		Vorbehandlung 22 Stunden		Vorbehandlung 22+17 Stunden		Vorbehandl. 22+17+17 1/2 Stunden		Vorbehandl. 22+17+17 1/2 +17 Stunden	
	a	k · 10 ⁴	a	k · 10 ⁴						
0	7,11	—	7,12	—	7,12	—	7,05	—	7,11	—
15	5,93	39	4,93	77	4,66	88	4,15	108	4,32	102
25	5,25	38	3,61	81	3,22	93	2,89	103	2,86	105
35	4,52	40	2,62	81	2,06	96	1,55	111	1,74	105
40	4,28	39	2,19	81	1,60	96	1,11	110	1,35	103
∞	2,28	—	2,28	—	2,28	—	2,26	—	2,28	—
	Trocken- substanz = 32,69 %		Trocken- substanz = 25,63 %		Trocken- substanz = 24,12 %		Trocken- substanz = 27,79 %		Trocken- substanz = 28,39 %	

Tabelle 2.

Vorbehandlung in Lösung 1 Stunden	Stickstoffgehalt % der Trocken- substanz	Glykogengehalt % der Trocken- substanz	k · 10 ⁴ Red.	K = N ₂ -Gehalt × Glykogen- gehalt
0	8,56	22,50	36	193
22	10,07	16,37	95	165
22+17	9,82	23,20	117	228
22+17+17 1/2	8,96	27,75	118	249
22+17+17 1/2 +17	8,98	28,17	111	253

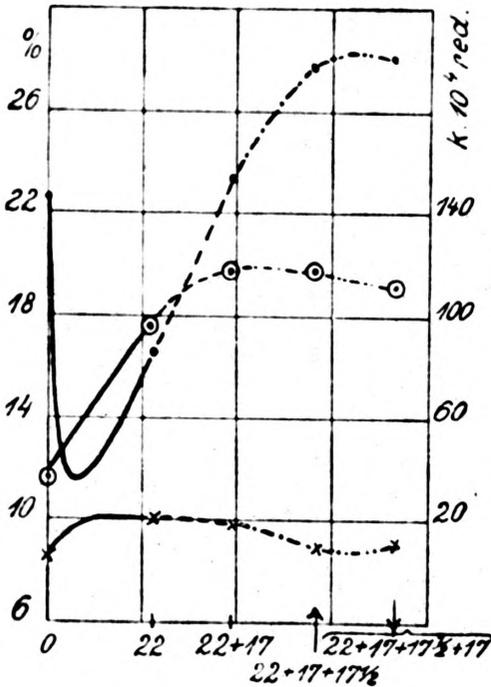
Diese Tabelle ist graphisch in Fig. 2 dargestellt.

In die Augen fallend ist, daß eine Vermehrung des Glykogens von einer gleichzeitigen Abnahme des Stickstoffs und ebenso ein Abnehmen des Glykogens von einer Zunahme des Stickstoffs begleitet ist. Jedoch besteht, wie aus Fig. 2 und der letzten Kolumne der Tab. 2 hervorgeht, keinerlei Proportionalität. Die Größe K ist das Produkt des Glykogen- und Stickstoffgehaltes. Die Variationen der Invertasetätigkeit stimmen mit den von Euler und Mitarbeiter gefundenen.

Versuchsreihe 3.

Man hat gefunden, daß eine, wenn auch viel geringere, Invertasebildung eintritt, selbst wenn der zur Vorbehandlung

Fig. 2.



x Stickstoffgehalt.

• Glykogengehalt.

◉ Inversionskonstanten.

zurückgeführt. Die Resultate gehen aus den folgenden Tabellen hervor:

Inversionstabelle der Reihe 3.

t	Ohne Vorbehandlung		Vorbehandl. 20 Stunden in Lösung 2		Vorbehandl. 20 + 20 Std. in Lösung 2		Vorbehandlung 20 + 20 Std. in Lös. 2 + 20 > > > 1		Vorbehandlung 20 + 20 Std. in Lös. 2 + 20 > > > 1 + 20 > > > 2	
	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴
0	7,08	—	7,06	—	6,99	—	6,93	—	6,89	—
15	—	—	5,35	59	5,14	65	4,41	93	4,36	94
16	6,06	31	—	—	—	—	—	—	—	—
25	5,40	34	4,36	59	4,19	63	3,15	93	3,28	88
35	4,83	34	3,48	60	3,27	64	1,96	97	2,14	92
40	4,52	35	3,01	62	2,59	70	1,45	99	1,67	93
x	— 2,27	—	— 2,26	—	— 2,24	—	— 2,22	—	— 2,20	—
	Trockensubstanz = 31,32%		Trockensubstanz = 27,47%		Trockensubstanz = 27,59%		Trockensubstanz = 25,92%		Trockensubstanz = 31,30%	

verwandten Lösung überhaupt kein Stickstoff zugesetzt wird. Es war nun von Interesse zu untersuchen, ob die Glykogenbildung in stickstofffreier Nährlösung ebenso groß ist als in Gegenwart von Stickstoffverbindungen. Am Anfang wurde die Hefe in Lösung 2 eingimpft (also in eine Lösung ohne Stickstoff), nach 20 Stunden in frische Lösung gleicher Zusammensetzung übergeführt und dort noch 20 Stunden vorbehandelt. Um jetzt den Effekt von einer stickstoffhaltigen Lösung nach dieser Vorbehandlung zu sehen, wurde die Hefe in Lösung 1 überimpft und nach 20 Stunden wieder in eine frische Lösung 2

Tabelle 3.

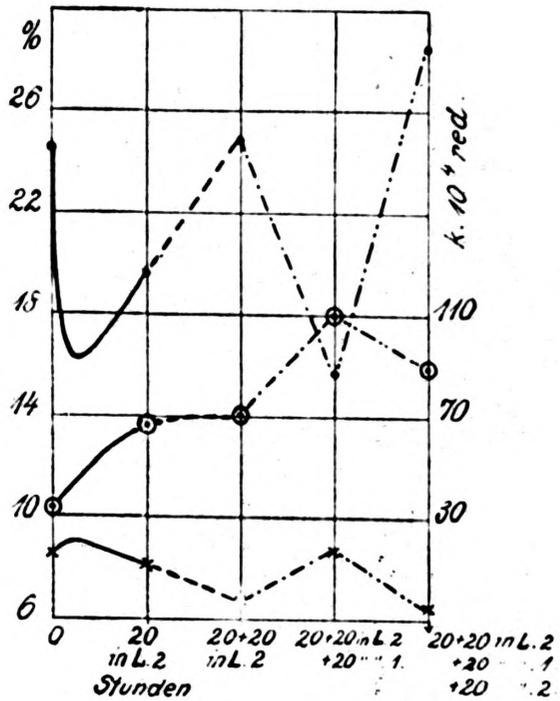
	Vorbehandlung Stunden	Stickstoffgehalt % der Trocken- substanz	Glykogengehalt % der Trocken- substanz	k · 10 ⁴ Reduziert
1.	0	8,59	24,61	33
2.	20 in Lösung 2	8,18	19,60	66
3.	20 + 20 » » 2	6,78	24,87	71
4.	20 + 20 » » 2	8,68	15,86	110
	+ 20 » » 1			
5.	20 + 20 » » 2	6,41	28,53	88
	+ 20 » » 1			
	+ 20 » » 2			

Die Werte dieser Tabelle sind graphisch in Figur 3 dargestellt.

Wie zu erwarten war, sinkt der Stickstoffgehalt schon im Anfang der Vorbehandlungen. Das Glykogen variiert dagegen in derselben Weise wie in der Versuchsreihe 2 (mit stickstoffhaltiger Nährlösung). Die Invertasevermehrung ist nicht so kräftig wie früher in Lösung 1.

Dann folgt der plötzliche Wechsel von Nährlösung. Der Gehalt an Stickstoff wird jetzt kräftig gesteigert und der Glykogengehalt sinkt ebenso kräftig. Auf die erneute Einimpfung in Nährlösung ohne Stickstoff folgt eine entgegengesetzte Wirkung. Die hierdurch erhaltenen Schwankungen sind sehr beachtenswert. Von 3. bis 4. der Tabelle 3

Fig. 3.



- × Stickstoffgehalt
- Glykogengehalt.
- ⊙ Inversionskonstanten.

Die hierdurch erhaltenen Schwankungen sind sehr beachtenswert. Von 3. bis 4. der Tabelle 3

beträgt die Zunahme des Stickstoffgehaltes etwa 30% und die Verminderung des Glykogengehaltes etwa 36%, und von 4. bis 5. vermindert sich der Gehalt an Stickstoff mit etwa 26%, während der Glykogengehalt mit etwa 80% zunimmt. Die Einwirkung des Gehaltes an Stickstoff der Nährlösung auf die Glykogenbildung ist früher von Kaiser und Boullanger¹⁾ hervorgehoben.

Es bleibt fraglich, ob mit der Vermehrung oder Verminderung des Stickstoffgehaltes wirklich ein Stoffwechselfvorgang eintritt, durch welchen Glykogen verbraucht oder gebildet wird, oder ob die Ab- und Zunahme des Glykogens nur darin zu suchen ist, daß die Veränderung des Gehaltes eines Hefebestandteiles notwendig eine Veränderung des Gehaltes eines anderen zur Folge hat. Im letzteren Falle möchte die Variation der Stoffe gleich, aber entgegengesetzt gerichtet sein. Dies ist aber, wie aus Tabelle 3 hervorgeht, nicht der Fall. Vergleicht man z. B. daselbst die Punkte 2 und 3, so entspricht einer Stickstoffverminderung von 1,4% bzw. einer Eiweißverminderung von 9,33% eine Glykogenvermehrung von 5,27%.

Betreffs des Invertasegehaltes ist zu bemerken, daß er in der stickstoffhaltigen Lösung kräftig gesteigert wird, und daß er bei der Zurückimpfung in die stickstofffreie Lösung wieder sinkt.

Versuchsreihe 4.

Aus der Versuchsreihe 1 geht hervor, daß die Variationen besonders während der ersten Stunden nach der Einimpfung von der Hefe in frische Nährlösung bedeutend sind. Eine Ergänzung einer der Reihe 2 oder 3, in welchen wiederholte Überimpfungen vorgenommen worden waren, war also sehr wünschenswert. Die folgenden Versuche sind wie die der Reihe 2 angestellt. Die Hefe wurde also in Lösung 1 vorbehandelt.

In der folgenden Tabelle 4 sind die Resultate zusammengestellt. Die Inversionskonstanten sind dort, wie gewöhnlich, auf einen Trockengehalt von 30% reduziert.

¹⁾ l. c.

Invertasetabelle¹⁾ der Reihe 4.

t	Vor- behandlung 21 Stunden		Vor- behandlung 45 ¹ / ₂ Std.		Vor- behandlung 117 Stunden		Vor- behandlung 21 + 3 ¹ / ₂ Std.		Vor- behandlung 21 + 21 Std.		Vor- behandlung 21 + 44 Std.		Vor- behandlung 21 + 44 + 21 Std.		Vor- behandlung 21 + 44 + 45 Std.		
	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	
0	6,11	—	6,07	—	5,80	—	6,11	—	6,07	—	6,02	—	5,97	—	5,80	—	
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(3,19	181)	
15	3,99	88	3,52	111	2,73	148	3,99	88	3,51	111	2,72	155	2,55	165	—	—	
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,34	190	
25	2,87	89	2,30	111	1,24	157	2,84	90	2,18	115	1,15	165	1,14	165	—	—	
30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,14	194	
35	1,83	93	1,24	115	0,28	158	1,89	92	1,21	116	0,23	162	0,06	172	—	—	
40	1,38	96	0,73	119	—	167	1,45	94	0,77	118	—	167	—	176	—	—	
∞	1,96	—	1,94	—	1,86	—	1,96	—	1,94	—	1,93	—	1,91	—	1,86	—	
	Trocken- substanz = 25,92%		Trocken- substanz = 27,34%		Trocken- substanz = 30,03%		Trocken- substanz = 26,42%		Trocken- substanz = 27,98%		Trocken- substanz = 28,99%		Trocken- substanz = 28,91%		Trocken- substanz = 30,96%		Trocken- substanz = 30,71%

¹⁾ Die Bestimmungen der Inversionskonstanten der Hefe ohne Vorbehandlung und nach 4 Stunden Vorbehandlung sind durch einen Unfall mißglückt.

Tabelle 4.

(In Fig. 4 graphisch dargestellt.)

	Vorbehandlung in Lösung 1 Stunden	Stickstoffgehalt % der Trockensubstanz	Glykogengehalt % der Trockensubstanz	k · 10 ⁴ Reduziert
A.	0	8,94	19,06	—
	4	9,83	15,89	—
	21	9,63	9,57	107
	45½	9,97	10,34	125
	117	10,23	4,79	158
B.	21 + 3½	9,34	16,25	103
	21 + 21	9,28	14,48	123
	21 + 44	9,11	13,74	168
C.	21 + 44 + 4	9,31	16,10	147
	21 + 44 + 21	8,57	17,63	165
	21 + 44 + 45	9,30	16,44	188

Gleichzeitig mit diesen Bestimmungen wurde bei jeder neuen Überimpfung die Gärungsgeschwindigkeit in einem besonderen Versuche ermittelt. Das Verhalten der Hefemenge zum Volumen der Lösung war dabei natürlicherweise dasselbe wie bei der Vorbehandlung; 0,25 g Hefe kam auf 25 ccm Lösung 1. Die Gärung geschah ebenso wie die Vorbehandlung bei 19° C. und wurde volumetrisch verfolgt. Die Gärungskolben waren durch Kapillarröhren mit Gasbüretten verbunden, in welchen die entwickelte Kohlensäure über Quecksilber gemessen wurde. Die Übersättigung von Kohlensäure wurde vor jeder Ablesung durch energisches Schütteln aufgehoben.

Die Gärungsgeschwindigkeit $\frac{\Delta v}{\Delta t}$ wird aus zwei successiven Ablesungen des Kohlensäurevolumens v_1 und v_2 zu den Zeiten t_1 und t_2 folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\Delta v}{\Delta t} = \frac{v_2 - v_1}{t_2 - t_1}$$

Das Mittel der erhaltenen Werte von $\frac{\Delta v}{\Delta t}$ im Bereich der Hauptgärung ist in der Kolumne $\frac{\Delta v}{\Delta t}$ red. auf einen gemeinsamen Trockengehalt von 30% reduziert.

Gärungstabelle der Versuchsreihe 4.

Ohne Vorbehandlung				Vorbehandlung 21 Stunden				Vorbehandlung 21 + 44 Std.			
Zeit Min.	Entw. ccm CO ₂	$\frac{\Delta v}{\Delta t}$	$\frac{\Delta v}{\Delta t \text{ red.}}$	Zeit Min.	Entw. ccm CO ₂	$\frac{\Delta v}{\Delta t}$	$\frac{\Delta v}{\Delta t \text{ red.}}$	Zeit Min.	Entw. ccm CO ₂	$\frac{\Delta v}{\Delta t}$	$\frac{\Delta v}{\Delta t \text{ red.}}$
31	3,5	0,13	0,21	31	1,9	0,16	0,23	31	6,0	0,14	0,19
133	17,2	0,23		122	16,7	0,19		110	16,7	0,18	
151	21,3	0,21		154	22,7	0,20		173	27,8	0,18	
194	30,2	0,22		226	37,0	0,20		254	42,0	0,23	
216	35,0	0,21		309	53,9	0,24		335	60,2	0,17	
278	47,7	0,34		376	70,2			390	69,7		
303	56,2	0,27		19 · 60	105,6			18,5 · 60	109,0		
369	74,2			23 · 60	114,1			22 · 60	113,0		
19 · 60	112,8										
20,5 · 60	115,2										
24 · 60	115,4										
Trockensubstanz = 32,85%				Trockensubst. = 25,92%				Trockensubstanz = 28,99%			

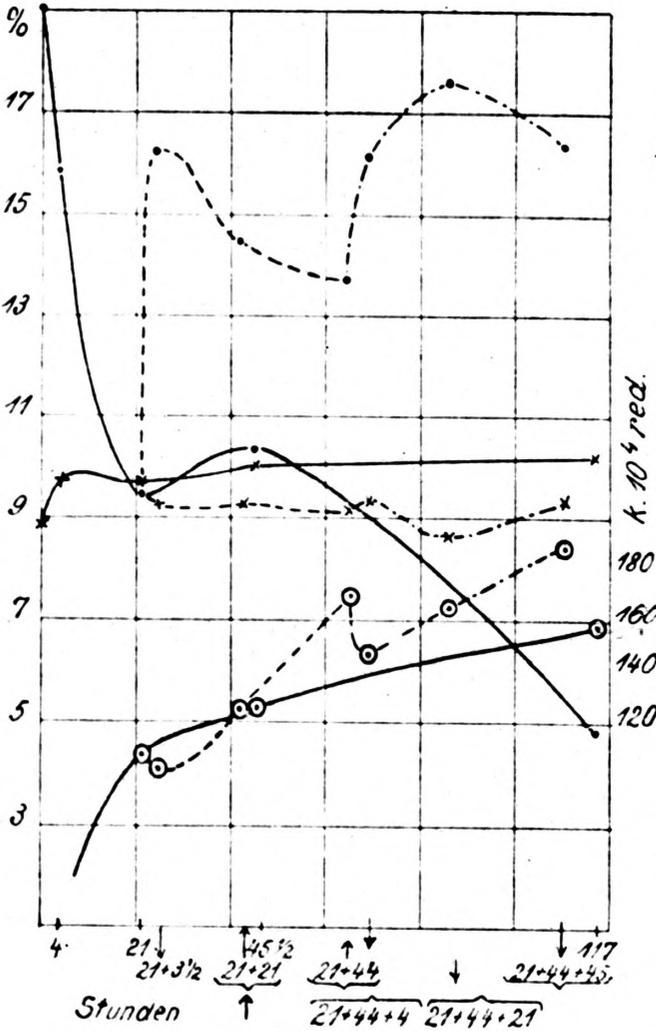
Wie aus der Gärungstabelle hervorgeht, ist die Gärungsgeschwindigkeit in den drei Fällen sehr wenig verschieden.¹⁾ Die Gärung ist innerhalb 20 Stunden, praktisch genommen, zu Ende gegangen. Die hauptsächliche Gärung geschieht innerhalb 6 Stunden.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in mehreren Beziehungen unerwartet. Betreffs des Stickstoffs ist die Übereinstimmung der ersten Phase der Versuche mit der Versuchsreihe 1 nicht ganz genügend. Man sollte erwarten, daß der Wert 9,83% etwas niedriger und der Wert 9,63 etwas höher sei. Gerade dieselben Schwankungen des Stickstoffs, wie die jetzt gefundenen, werden aber in der Versuchsreihe 6 wieder gefunden.

¹⁾ Die aus der Tabelle hervorgehenden kleinen Veränderungen der Gärungsgeschwindigkeit stehen in guter Übereinstimmung mit den Gärungsversuchen von Euler und Johansson (Diese Zeitschr., Bd. 84, S. 97, 1913), welche nach Vorbehandlung in ähnlicher Nährlösung vorgenommen sind. Diese Autoren zeigen, daß die Gärkraft der Hefe innerhalb 24 Stunden nach der Einimpfung in neue Lösung ein wenig gesteigert wird, um bei längeren Vorbehandlungszeiten erheblich geschwächt zu werden.

Betreffs des Glykogens erwartete ich, daß der Gehalt dieses Stoffes bei jeder neuen Überimpfung die typische, kräftige Verminderung erfahren würde, um dann wieder zu wachsen.

Fig. 4.



x Stickstoffgehalt.

• Glykogengehalt.

⊙ Inversionskonstanten.

Auch bei den Vermehrungskurven der Invertase ist ein nicht vorher betonter Umstand zu bemerken. Nach der Überimpfung gehen diese Kurven durch ein Minimum, um dann wieder zu steigen. Dieses Minimum der Invertasewirkung scheint mit dem von Euler und Johansson nachgewiesenen Maximum der Gärkraft zusammenzufallen. Man beobachtet auch, daß diese Minima der Invertasekurven mit dem

Die mit der Serie 2 vergleichbaren Werte der vorliegenden Reihe zeigen eine genügende Übereinstimmung. Die erwartete Abnahme des Glykogengehaltes unmittelbar nach der Überimpfung blieb jedoch aus; vielmehr erwies sich eine deutliche Vermehrung. Diese bemerkenswerte Tatsache will ich besonders hervorheben; sie scheint in einer gewissen Übereinstimmung mit den genannten Erfahrungen von Pavy und Bywaters zu stehen.

Ansteigen des Glykogens nach der Überimpfung zusammenfallen.

Versuchsreihe 5.

Eine Erklärung der bemerkenswerten Veränderungen des Glykogengehaltes beim Gärungsvorgang zu versuchen, ist noch zu früh. Die Frage liegt jedoch nahe, ob der Verlauf der Gärung derselbe sei, gleichgültig ob nach der Impfung der Glykogengehalt zunimmt, oder ob diese Größe sinkt. Ein Studium des Vermögens der Hefe, die von Euler und Mitarbeiter¹⁾ studierte Differenz ($\Delta - C$) (also zwischen der bei der Gärung verschwindenden Menge Zucker und der gleichzeitig auftretenden Kohlensäure) auszubilden, konnte möglicherweise einen Aufschluß über diese Frage geben. Kann nämlich keine erhebliche Veränderung bei der Bildung dieser Differenz nachgewiesen werden, so hat man keine Ursache, auf einen veränderten Gärungsvorgang zu schließen. Wie aus den Gärungstabellen der Versuchsreihe 4 hervorging, ist die Gärungsgeschwindigkeit bei den drei Impfungen beinahe dieselbe.

Die Bestimmung der Größe $\Delta - C$ geschah folgenderweise: 1 g vorbehandelte Hefe (auf Ton abgepreßt und mit einem Trockengehalt von etwa 27%) wurde in 20 ccm etwa 10%iger Glukoselösung aufgeschlemmt. Der Glukosegehalt der Lösung wurde aus der Anfangsdrehung genau berechnet. Die Kolben mit dieser Flüssigkeit waren in einen Ostwaldschen Thermostaten mit einer Temperatur von genau 30° eingetaucht. Die Kolben waren wie gewöhnlich durch Kapillarröhren mit dem oberen Ende von Gasbüretten verbunden, in welchen die entwickelte Kohlensäure über Quecksilber gemessen wurde. Nach gewissen Zeiten wurde von der Hefe schnell durch gehärtete Faltenfilter abfiltriert, und die klare Lösung im Polarisationsapparat untersucht und zwar im 1-dm-Rohr bei etwa 19°.

Die Vorbehandlung wurde wie in den vorigen Versuchen vorgenommen. Parallele Versuche mit Vorbehandlung in Lösung mit und ohne Stickstoff (Lösung 1 und 2) wurden gemacht. Ich stelle die Versuche in der folgenden Tabelle zusammen.

¹⁾ l. c.

Tabelle 5.

Vor- behand- lung	Druck und Tem- peratur der ge- messenen CO ₂	Zeit Min.	Ent- wickelte CO ₂		Drehung in Graden	Drehungs- 4nderung		Diff. Δ—C	Glykogen- gehalt der Hefe ‰ der Trocken- substanz
			ccm	‰ C		Grade	‰ Δ		
Ohne Vor- behand- lung	752.8 mm Hg 18,6° C.	0	0	—	10,14	—	—	—	} 22,22
		60	66	12,82	8,18	1,96	19,33	6,51	
		120	130	25,24	6,89	3,25	32,05	(6,81)	
		180	195	37,86	5,45	4,69	46,25	8,39	
∞	515	—	0	10,14	—	—	—		
19 Stunden in L6sung 1	747 mm Hg 19° C.	0	0	—	10,14	—	—	—	} 12,58
		60	73	14,07	8,09	2,05	20,22	6,15	
		120	145	27,94	6,55	3,59	35,40	7,46	
		180	209	40,27	5,20	4,94	48,72	8,45	
∞	519	—	0	10,14	—	—	—		
19 + 20 Stunden in L6sung 1	751,5 mm Hg 19° C.	0	0	—	10,06	—	—	—	} 13,54
		60	64	12,50	8,23	1,83	18,19	5,69	
		120	128	25,00	6,93	3,13	31,11	6,11	
		180	192	37,50	5,67	4,39	43,64	6,14	
∞	512	—	0	10,06	—	—	—		
22 Stunden in L6sung 2	746,5 mm Hg 19,5° C.	0	0	—	10,14	—	—	—	} 20,91
		60	62	11,90	8,49	1,65	16,27	4,37	
		120	126	24,18	6,96	3,18	31,36	7,18	
		180	189	36,28	5,77	4,37	43,10	6,82	
∞	521	—	0	10,14	—	—	—		
22 + 23 Stunden in L6sung 2	752,1 mm Hg 19,5° C.	0	0	—	10,06	—	—	—	} 25,98
		60	65	12,67	8,35	1,71	17,00	4,33	
		120	120	23,39	7,01	3,05	30,32	6,93	
		180	172	33,53	6,02	4,04	40,16	6,63	
∞	513	—	0	10,06	—	—	—		

Das Entstehen der Differenzen Δ—C ist in Fig. 5 graphisch dargestellt.

Die entstehenden Ver4nderungen der Differenz Δ—C sind offenbar so klein, daβ Schl6sse daraus in bezug auf den G4rungsvorgang nicht gezogen werden k6nnen. Man sieht, daβ das

Maximum der Differenz nach den Vorbehandlungen ein wenig abnimmt. Wie Euler und Johansson¹⁾ betont haben, könnte man annehmen, daß sie durch die Wirkung eines Enzymes entstehen.

Der Verlauf der Gärung ist hiernach derselbe, sei es, daß der Glykogengehalt im Anfang der Gärung zunimmt, oder daß diese Größe dann abnimmt.

Versuchsreihe 6.

Ich führe schließlich noch einige Vorbehandlungsversuche an, welche mit einer Lösung vom doppelten Zuckergehalt angestellt sind (Lösung 3 mit 40 g Zucker im Liter). In der zweiten Phase der Reihe sind parallele Versuche mit der früheren Lösung 1 durchgeführt.

Tabelle 6.

(In Fig. 6 graphisch dargestellt.)

Vorbehandlung Stunden	Stickstoffgehalt ^o / _o der Trockensubstanz	Glykogengehalt ^o / _o der Trockensubstanz
0	9,54	18,34
3 in Lösung 3	10,03	10,07
24 „ „ 3	9,75	11,08
51 „ „ 3	10,14	9,95
24 + 3 in Lösung 3	9,03	12,05
24 + 24 „ „ 3	9,03	19,80
24 + 24 + 18 in Lösung 3	8,63	22,60
24 in Lös. 3 + 3 in Lösung 1	8,89	15,09
24 „ „ 3 + 24 „ „ 1	9,24	15,70

Man sieht, daß die Veränderungen in Übereinstimmung mit den früher erhaltenen sind. Auffallend sind die Stickstoffkurven, welche mit denen der Fig. 4 übereinstimmen.

Die beiden Parallelversuche scheinen miteinander nicht ganz übereinzustimmen. Nach 24 Stunden erwächst der Glykogengehalt bei der Vorbehandlung in der an Zucker reicheren

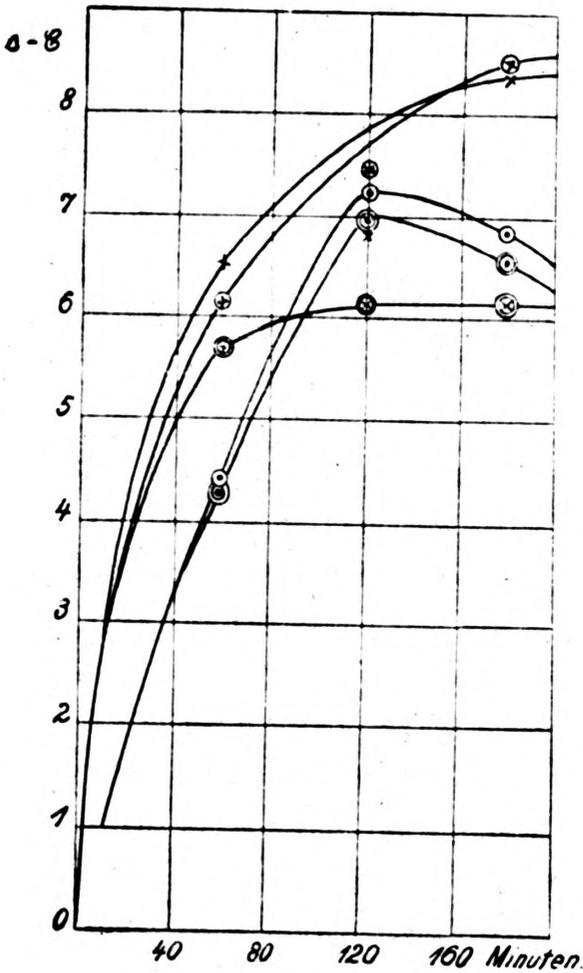
¹⁾ l. c.

Lösung in höherem Grade als in der an Zucker ärmeren. Dagegen ist das Ansteigen der Kurve schneller in letzterem Falle.

Zusammenfassung.

Ein Zusammenhang zwischen Stickstoff und Glykogen der Hefe war früher insofern untersucht worden, als man verschiedene Rassen in bezug auf beide Stoffe verglichen hat. Dagegen sind bis jetzt bei einer und derselben Reinkulturhefe die Variationen beider Stoffe nicht gleichzeitig verfolgt worden. Dies war die Hauptaufgabe der vorliegenden Untersuchung.

Fig. 5.



- x Ohne Vorbehandlung.
- ⊗ Vorb. 19 Stunden in Lösung 1.
- ⊗ " . 19+20 " " " " 1.
- ⊙ " . 22 " " " " 2.
- ⊙ " . 22+23 " " " " 2.

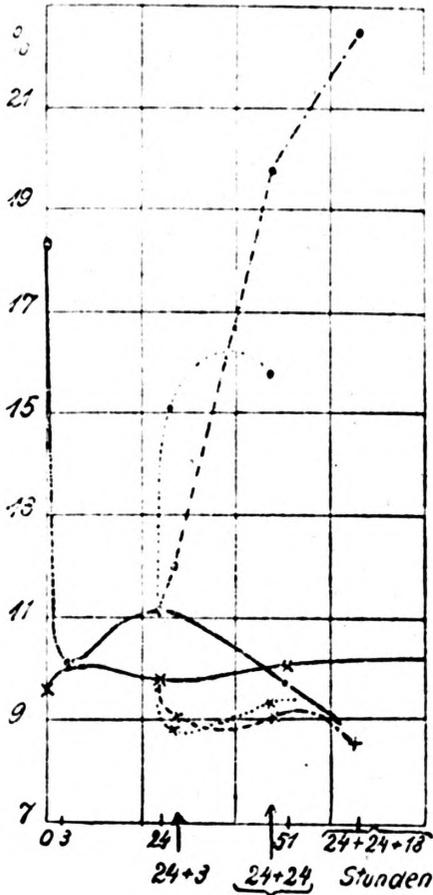
Dabei hat sich im allgemeinen die durch Vergleich verschiedener Hefen von Schönfeld gefundene Regel bestätigt, daß höherer Glykogengehalt niederm Stickstoffgehalt entspricht und umgekehrt. Die Untersuchung zeigt jedoch, daß man von einer inversen Proportionalität dieser Größen nicht reden kann.

Aus dem quantitativen Vergleich geht hervor, daß wirklich große Veränderungen in der Glykogensubstanz beziehungsweise der hochmolekularen Kohlehydrate eintreten.

große Veränderungen in der Glykogensubstanz beziehungsweise der hochmolekularen Kohlehydrate eintreten.

Es hat sich bestätigt, daß in untergäriger Bierhefe zu Anfang der Gärung der Glykogengehalt erheblich sinkt. Als wesentlich neues Resultat möchte aber festgestellt werden, daß eine solche Verminderung des Glykogens durch die

Fig. 6.



x Stickstoffgehalt.
• Glykogengehalt.

Gärung bei vorbehandelter Hefe nicht eintritt, sondern daß hier im Gegenteil das Glykogen stark wächst. Bei den gleichzeitigen Invertasebestimmungen bemerkt man, daß die Minima des Invertasegehaltes mit diesen Erhöhungen des Glykogengehaltes zusammenfallen. Die Gärkraft bleibt bei dieser Vorbehandlung konstant.

Ein bemerkenswertes Ergebnis ist ferner folgendes: Wird die Hefe nach 20ständiger Vorbehandlung wiederholt in neue Nährlösung übergeimpft, so steigt mit jeder Überführung der Glykogengehalt und erreicht schließlich ein Maximum (hier ca. 28%) (vgl. Fig. 2). Also tritt hier bei jeder folgenden Gärung der Hefe in 2% iger Rohrzuckerlösung eine Steigerung des Glykogens ein.

Worauf die auffallenden Variationen des Glykogens in vorbehandelter Hefe beruhen, konnte bis jetzt nicht festgestellt werden.

Herrn Prof. H. v. Euler, welcher mich zu vorliegender Untersuchung angeregt hat, spreche ich meinen aufrichtigsten Dank für seine Unterstützung aus.