

äthylester hin, eine Verbindung für welche auch der beobachtete Siedepunkt spricht. Um sicher erweisen zu können, dass das fragliche Oel wirklich Hydrozimmtsäureester ist, haben wir dasselbe mit Kalilauge verseift und aus der klaren Lösung durch Salzsäure die organische Säure gefällt. Diese Säure erweist sich denn in der That identisch mit Hydrozimmtsäure, denn sie krystallisiert aus siedendem Wasser in Nadeln, schmilzt bei 49° und liefert bei der Analyse die erfordernten Werthe.

Analyse: Ber. für $C_9H_{10}O_2$.

Procente: C 72.00, H 6.66
Gef. 72.38, 6.22.

Dem Destillationsrückstande entzieht siedendes Aceton eine Substanz, welche aus Aceton und Alkohol krystallisirt, Schwefel in nicht abspaltbarer Form enthält, bei 119° schmilzt und nach der Analyse aus Diphenylthiophen besteht.

Analyse: Ber. für $C_{16}H_{12}S$.

Procente: C 81.36, H 5.17, S 13.7.
Gef. 81.31, 5.31, 13.95.

Nachschrift.

Die Hauptdaten der vorliegenden Arbeit sind bereits vor beinahe zwei Jahren gewonnen worden. Durch allerlei ausserhalb dieser Arbeit liegende Umstände ist indessen die Veröffentlichung desselben bis über den Tod des Herrn Prof. Dr. Baumann hinaus verzögert worden. Ich übergebe hiermit diese Mittheilung durch einige neue Versuche erweitert und ergänzt der Oeffentlichkeit, um die letzte Arbeit, welche ich mit meinem lieben Lehrer gemeinsam habe machen dürfen, nicht in Vergessenheit gerathen zu lassen. E. Fromm.

Freiburg i. B. Chem. Univ.-Lab., Abth. der med. Fakultät.
Januar 1897.

19. Eduard Buchner: Alkoholische Gährung ohne Hefezellen.

[Vorläufige Mittheilung.]

(Eingegangen am 11. Januar.)

Eine Trennung der Gährwirkung von den lebenden Hefezellen ist bisher nicht gelungen; im Folgenden sei ein Verfahren beschrieben, welches diese Aufgabe löst.

1000 g für die Darstellung von Presshefe gereinigte, aber noch nicht mit Kartoffelstärke versetzte Brauereibierhefe¹⁾ wird mit dem

¹⁾ Dieselbe ist von oberflächlich anhaftendem Wasser soweit befreit, dass bei einem Druck von 25 Atmosphären kein Wasser mehr abgeht.

gleichen Gewichte Quarzsand¹⁾ und 250 g Kieselguhr sorgfältig gemengt und sodann zerrieben, bis die Masse feucht und plastisch geworden ist. Man setzt dem Teige nun 100 g Wasser zu und bringt ihn, in ein Presstuch eingeschlagen, allmählich unter einen Druck von 4—500 Atmosphären: es resultiren 300 ccm Presssaft. Der rückständige Kuchen wird abermals zerrieben, gesiebt und mit 100 g Wasser versetzt; von Neuem in der hydraulischen Presse dem gleichen Drucke unterworfen, giebt er noch 150 ccm Presssaft. Aus einem Kilo Hefe gewinnt man also 500 ccm Presssaft, welche gegen 300 ccm Zellinhalts-substanzen enthalten. Zur Entfernung einer spurenhafte Trübung wird der Presssaft endlich noch mit 4 g Kieselguhr geschüttelt und unter mehrmaligem Aufgiessen der ersten Antheile durch ein Papierfilter filtrirt.

Der so erhaltene Presssaft stellt eine klare, nur opalisirende, gelbe Flüssigkeit von angenehmem Hefegeruch dar. Das spec. Gewicht wurde einmal zu 1.0416 (17° C.) gefunden. Beim Kochen tritt starke Ausscheidung von Gerinnsel ein, so dass die Flüssigkeit fast vollständig erstarrt: die Bildung von unlöslichen Flocken beginnt bereits bei 35—40°; schon vorher wird Aufsteigen von Gasbläschen, nachweislich Kohlensäure bemerkt, mit welcher die Flüssigkeit demnach gesättigt ist²⁾. Der Presssaft enthält über 10 pCt. Trockensubstanz. In nach einem früheren, weniger guten Verfahren hergestelltem Presssaft waren 6.7 pCt. Trockensubstanz, 1.15 pCt. Asche und, nach dem Stickstoffgehalt zu schliessen, 3.7 pCt. Eiweissstoffe vorhanden.

Die interessanteste Eigenschaft des Presssaftes besteht darin, dass er Kohlenhydrate in Gährung zu versetzen vermag. Beim Mischen mit dem gleichen Volumen einer concentrirten Rohrzuckerlösung tritt schon nach $\frac{1}{4}$ - 1 Stunde regelmässige Kohlensäureentwicklung ein, die Tage lang andauert. Ebenso verhalten sich Trauben-, Frucht- und Malz-Zucker; keine Gährungserscheinungen treten dagegen in Gemischen des Presssaftes mit gesättigter Milchzucker-, sowie mit Mannit-Lösung auf, wie ja diese Körper auch durch lebende Bierhefezellen nicht vergohren werden. Mehrere Tage in Gährung befindliche, im Eisschrank aufgestellte Mischungen von Presssaft und Zuckerlösung trüben sich allmählich, ohne dass mikroskopisch Organismen aufzufinden sind; dagegen zeigen sich bei 700facher Vergrösserung ziemlich zahlreiche Gerinnsel von Eiweissstoffen, deren Ausscheidung

¹⁾ Glaspulver ist wegen seiner Wirkung als schwaches Alkali weniger geeignet.

²⁾ Die Pflanzenphysiologen mögen entscheiden, ob diese Kohlensäure etwa von den mit der Athmung zusammenhängenden Oxydationsprocessen her stammt.

wahrscheinlich durch bei der Gährung entstandene Säuren bedingt wurde. Sättigen des Gemisches von Presssaft und Saccharoselösung mit Chloroform verhindert die Gährung nicht, führt aber frühzeitig zu geringer Eiweissausscheidung. Ebenso wenig vernichtet Filtriren des Presssaftes durch ein sterilisirtes *Berkefeldt*-Kieselgubrfilter, welches sicher alle Hefezellen zurückhält, die Gahrkraft; das Gemisch des ganz klaren Filtrates mit sterilisirter Rohrzuckerlösung geräth, wenn auch unter Verzögerung, nach etwa einem Tag, selbst bei der Temperatur des Eisschranks, in Gährung. Beim Einhängen eines mit Presssaft gefüllten Pergamentpapierschlauches in 37-proc. Rohrzuckerlösung bedeckt sich nach einigen Stunden die Oberfläche des Schlauches mit zahllosen, winzigen Gasbläschen; natürlich war auch im Innern infol gehineindiffundirens von Zuckerlösung lebhafte Gasentwicklung zu bemerken. Weitere Versuche müssen entscheiden, ob thatsächlich der Träger der Gährwirkung durch das Pergamentpapier zu diosmiren vermag, wie es den Anschein hat. Das Gahrvermogen des Presssaftes geht mit der Zeit allmählich verloren; fünf Tage in Eiswasser in halbvoller Flasche aufgehobener Presssaft erwies sich als inactiv gegenüber Saccharose. Es ist merkwürdig, dass dagegen mit Rohrzucker versetzter, also gahrthatiger Presssaft die Gährwirkung im Eisschrank mindestens zwei Wochen lang behält. Man muss dabei wohl zunächst an eine günstige, den Luftsauerstoff abhaltende Einwirkung der bei der Gährung gebildeten Kohlensäure denken; es könnte aber auch der leicht assimilirbare Zucker zur Erhaltung des Agens beitragen.

Um über die Natur der wirksamen Substanz im Presssaft Aufschluss zu erhalten, sind bisher nur wenige Versuche ausgeführt. Beim Erwärmen von Presssaft auf 40–50^o tritt zunächst Kohlensäureentwicklung, dann allmählich Ausscheidung von geronnenem Eiweiss auf; nach einer Stunde wurde unter mehrmaligem Zuruckgiessen abfiltrirt. Das klare Filtrat besass gegenüber Rohrzucker bei einem Versuch noch schwache Gahrkraft, bei einem zweiten jedoch nicht mehr; die wirksame Substanz scheint demnach entweder ihre Wirkung schon bei dieser auffallend niederen Temperatur einzubüssen oder zu gerinnen und auszufallen. Ferner wurden 20 ccm Auspress in das dreifache Volum absoluten Alkohols eingetragen, der Niederschlag abgeseugt und über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet; es resultirten 2 g trockene Substanz, welche sich beim Digeriren mit 10 ccm Wasser nur zum kleinsten Theil wieder auflösten. Das Filtrat davon besass auf Rohrzucker keine Gährwirkung. Diese Experimente müssen wiederholt werden; insbesondere soll ferner die Isolirung der wirksamen Substanz mittels Ammonsulfat versucht werden.

Für die Theorie der Gährung sind bisher etwa folgende Schlüsse zu ziehen. Zunächst ist bewiesen, dass es zur Einleitung

des Gährvorganges keines so complicirten Apparates bedarf, wie ihn die Hefezelle vorstellt. Als Träger der Gährwirkung des Presssaftes ist vielmehr eine gelöste Substanz, zweifelsohne ein Eiweisskörper zu betrachten; derselbe soll als Zymase bezeichnet werden.

Die Anschauung, dass ein den Hefezellen entstammender, besonders gearteter Eiweisskörper die Gährung veranlasse, ist als Enzym- oder Ferment-Theorie bereits 1858 von M. Traube ausgesprochen und später insbesondere von F. Hoppe-Seyler vertheidigt worden. Die Abtrennung eines derartigen Enzymes von den Hefezellen war aber bisher nicht geglückt.

Es bleibt auch jetzt noch fraglich, ob die Zymase direct den schon länger bekannten Enzymen zugezählt werden darf. Wie schon C. v. Nägeli¹⁾ betont hat, bestehen zwischen Gährwirkung und der Wirkung der gewöhnlichen Enzyme wichtige Unterschiede. Die letzteren sind lediglich Hydrolysen, welche durch einfachste chemische Mittel nachgeahmt werden können. Wenn auch A. v. Baeyer²⁾ den chemischen Vorgang bei der alkoholischen Gährung unserem Verständnisse näher gebracht hat, indem er ihn auf verhältnissmässig einfache Principien zurückführte, so gehört der Zerfall von Zucker in Alkohol und Kohlensäure doch immer noch zu den complicirteren Reactionen; es werden dabei Kohlenstoffbindungen gelöst, wie es in dieser Vollständigkeit durch andere Mittel bisher nicht erreicht wird. Auch in der Wärmetönung besteht ein bedeutender Unterschied³⁾.

Das Invertin lässt sich aus den durch trockene Hitze getödteten (eine Stunde auf 150° erhitzten) Hefezellen mittels Wasser ausziehen und durch Fällen mit Alkohol als in Wasser leicht lösliches Pulver isoliren. Auf die gleiche Weise ist der die Gährung bewirkende Stoff nicht zu erhalten. In den so hoch erhitzten Hefezellen wird er wohl überhaupt nicht mehr vorhanden sein; er geht durch Alkohol-fällung, wenn der oben angeführte Versuch einen Schluss gestattet, in eine in Wasser unlösliche Modification über. Man wird deshalb in der Annahme kaum fehlgehen, dass die Zymase zu den genuinen Eiweisskörpern gehört und dem lebenden Protoplasma der Hefezellen noch viel näher steht als das Invertin.

Äehnliche Ansichten hat der französische Bacteriologe Miguel bezüglich der Urase, des von den Bacterien der sog. Harnstoffgährung ausgeschiedenen Enzymes geäussert; er bezeichnet dieselbe direct als Protoplasma, das des Schutzes der Zellhaut entbehre, ausserhalb derselben wirke und sich hauptsächlich nur dadurch von dem-

¹⁾ Theorie der Gährung. München 1879. S. 15.

²⁾ Diese Berichte 3, 73.

³⁾ Die bei der alkoholischen Gährung durch Sprosshefe auftretende Wärmeentwicklung hat kürzlich A. Bouffard wieder bestimmt, Compt. rend. 121, 357.

jenigen des Zellinhaltes unterscheidet¹⁾. Auch die Erfahrungen von E. Fischer und P. Lindner²⁾ bezüglich Einwirkung des Hefepilzes *Monilia candida* auf Rohrzucker gehören hierher. Dieser Sprosspilz vergäht Saccharose; es war aber weder Ch. E. Hansen noch den genannten Autoren gelungen, aus frischer oder aus getrockneter Hefe ein invertinartiges Enzym, welches die vorübergehende Spaltung in Trauben- und Fruchtzucker besorgen würde, durch Wasser zu extrahieren. Ganz anders verlief der Versuch, als Fischer und Lindner frische *Monilia*-Hefe benutzten, in welcher durch sorgfältiges Zerreiben mit Glaspulver zuerst ein Theil der Zellen geöffnet wurde. Die invertirende Wirkung war nun unverkennbar. »Das invertirende Agens scheint allerdings hier kein beständiges in Wasser lösliches Enzym, sondern ein Bestandtheil des lebenden Protoplasma zu sein.«

Die Vergärung des Zuckers durch die Zymase kann nun innerhalb der Hefezellen stattfinden³⁾; wahrscheinlicher aber scheiden die Hefezellen diesen Eiweisskörper in die Zuckerlösung aus, wo er die Gärung bewirkt⁴⁾. Der Vorgang bei der alkoholischen Gärung ist dann vielleicht nur insofern als physiologischer Akt aufzufassen, als es die lebenden Hefezellen sind, welche die Zymase ausscheiden. Dass aus Hefezellen in anfänglich schwach alkalisch reagirender (durch K_3PO_4), später neutral werdender Nährlösung bei 30° schon nach 15 Stunden beträchtliche Mengen von durch Kochen gerinnbaren Eiweisskörpern herausdiesmiren, haben Nägeli⁵⁾ und O. Löw gezeigt. In der That scheint auch, wie der oben erwähnte Versuch zeigt, die Zymase durch Pergamentpapier hindurchzugehen.

¹⁾ Bemerkte muss hierbei allerdings werden, dass die sogen. Harnstoffgärung, der Zerfall des Harnstoffs in Ammoniak und Kohlensäure, chemisch sich ausserordentlich von den eigentlichen Gärungsvorgängen unterscheidet und deshalb von vielen überhaupt nicht als Gärung betrachtet wird. Es ist einfache Hydrolyse, schon durch Wasser bei 120° zu erreichen.

²⁾ Diese Berichte 28, 3037.

³⁾ Die diosmotischen Verhältnisse lassen dies als möglich erscheinen. Vergl. v. Nägeli, l. c. S. 39.

⁴⁾ Damit sind wahrscheinlich auch die Versuche von J. de Rey-Pailhade (Compt. rend. 118, 201) zu erklären, welcher aus frischer Bierhefe unter Zusatz von etwas Traubenzucker einen schwach alkoholischen (22-procentigen) Auszug bereitet hat. Nach Befreiung von Mikroorganismen mittels Filtriren durch eine sterile Arsonval-Kerze entwickelte dieser zuckerhaltige Auszug bei Sauerstoffabschluss spontan Kohlensäure.

⁵⁾ loc. cit. S. 94. Die Versuche wurden mit demselben Erfolge wiederholt; nur ergab sich, dass sie ebenso wie in Saccharose-, auch in Lactose-Lösungen verlaufen. Die Diffusionsvorgänge sind demnach nicht an die Ausübung der Gährthätigkeit gebunden, wie die genannten Autoren annahmen.

Gährversuche.

No.	Presssaft ccm	Kohlenhydrat- lösung ccm	Gesamt- Percent- gehalt an Zucker pCt.	Versuchs- temperatur	Beobachtungen
1	30	Saccharose 30	37	Eisschrank	Nach 1 Stunde deutliche Gasentwicklung, die nach 14 Tagen noch nicht beendet ist. Die Schaumschicht 1 trägt schliesslich 1 cm.
2	50		37		Starke Gasentwicklung u. Schaumschicht. Die erst klare Lösung opalis nach 3 Tg. ohne Eintritt einer Fällung
3	150	150	37		Die Schaumschicht beträgt nach 3 Tagen 4 cm.
4	20	20	37		Die Gasentwicklung wird nach zw. Stunden sichtbar u. ist nach 14 Tagen noch nicht beendet: die anfangs klare Flüssigkeit zeigt am Schluss nur minimale Trübung; Schaumschicht 1½ cm hoch
5	30	» 30	37		Gasentwicklung beginnt nach 1 Tag und ist nach 1 Woche noch nicht beendet; dabei ist die Lösung noch vollständig klar.
6	20	» 20	37	Zimmer- temperatur	Nach 1 Stunde lebhaft Gasentwicklung; auch nach 2 Wochen noch geringe Blasenbildung bei nur minimaler Trübung.
7	20	» 20	37	40°	Nach 2 Stunden bereits 10 cm hohe Schaumschicht; nach 1 Tag starke Gerinnelausscheidung; die Gasentwicklung ist beendet.
8	30	» 30	12	Eisschrank	Nach 6 Tagen noch starke Gasentwicklung; ferner Trübung, die aus feinst vertheiltem Gerinnsel besteht.
9	5	Maltose 5	33	»	Nach 1 Stunde Beginn der Gasentwicklung, die auch nach 12 Tagen noch andauert.
10	10		26		Die Gasentwicklung ist schon nach 3 Stunden ausserordentlich stark.
11	10	Glucose 10	33		Erst nach 20 Std. starke Gasentwicklung, die aber nach 12 Tagen noch andauert; Schaumschicht ¾ cm hoch.
12	10	» 10	26		Schon nach ½ Stunde ziemlich starke Gasentwicklung, die 12 Tage anhält; die Lösung wird dabei trübe und setzt etwas Niederschlag ab (s. u.)
13	10	Fructose 10	37		Die Gasentwicklung ist schon nach ¼ Stunde sehr stark u. nach 3 Tagen noch lebhaft im Gang; die Lösung bleibt dabei klar.
14	10		25	»	Die Schaumschicht ist nach 15 Minuten schon beträchtlich und misst nach 3 Tagen 1 cm.
15	10	Lactose 10	gesättigte Lösung	Zimmer- temperatur	Keine Gasentwicklung, auch nicht nach 6 Tagen.
16	0	Mannit 10	»	»	Wie bei Lactose.

Bemerkungen. Bei Versuch 1) wurde das entweichende Gas 4 Stunden nach Beginn der Entwicklung in Kalkwasser geleitet und als Kohlensäure identificirt. Bei 2) und 3) erfolgte nach 3 Tagen Bestimmung des durch Gährung gebildeten Alkohols; es waren bei 2) 1.5 g, bei 3) 3.3 g Aethylalkohol vorhanden; hiervon sind die Mengen in Abzug zu bringen, welche der verwendeten Hefe noch von der Bierbereitung her anhafteten. Bei 2) war die Hefe vor Herstellung des Presssaftes mit je 5 L Wasser noch 4 mal gewaschen worden; dann wurde in $\frac{2}{3}$ des Ganzen der Alkohol bestimmt, das Uebrige auf Presssaft verarbeitet; nach den Ergebnissen war in der verwendeten Hefe höchstens 0.3 g Alkohol vorhanden. Bei 3) wurde für die Presshefefabrikation gereinigte, aber noch nicht mit Stärke versetzte Bierhefe des Handels direct verarbeitet; der Alkoholgehalt der zur Herstellung von 150 ccm Presssaft nöthigen Hefe berechnet sich nach der ausgeführten Bestimmung zu 1.2 g. Sonach war bei 2) 1.2 g, bei 3) 2.1 g Alkohol durch Gährung entstanden. In allen Fällen wurde der Alkohol durch die Jodoformreaction identificirt und schliesslich mittels Pottasche aus der wässrigen Lösung ausgesalzen. Die bei 3) erhaltene Abscheidung ging vollständig zwischen 79—81° (734 mm) über, das Destillat war farblos, brennbar und besass den Geruch des Aethylalkohols.

Mikroskopisch untersucht wurden die Versuche 2) und 3), nachdem sie 3 Tage im Gange waren, ferner 8) nach 6tägiger Dauer und von 12) nach 12 Tage während Gährung der geringe Bodensatz: in allen Fällen fanden sich keine Organismen, sondern lediglich Eiweissgerinnsel als Ursache der mehr oder minder starken Trübung. Von Versuch 3) wurden ausserdem bei seiner Unterbrechung nach im Ganzen 3 tägiger Dauer noch 6 Plattenculturen angelegt. Je 1 ccm Flüssigkeit kam zur Aussaat in 3 Röhrchen mit verflüssigter Bierwürzelatine, und je 1 ccm in 3 Röhrchen mit verflüssigter Fleischwasserpeptongelatine. Nach 6 Tagen zeigte eine Würzelatineplatte 11 Colonieen, die beiden anderen waren steril geblieben; die 3 Peptongelatineplatten wiesen gleichmässig je 50 — 100 Colonieen auf und waren verflüssigt worden. In Anbetracht der bei diesen Versuchen zur Aussaat gelangten grossen Flüssigkeitsmengen beweisen die Ergebnisse, dass die Gährwirkung nicht von Mikroorganismen ausgegangen ist, was übrigens schon durch das rasche Auftreten der Gährungserscheinungen beinahe ausgeschlossen ist.

Endlich wurde bei den Versuchen 4) und 5) der Presssaft durch sterilisirte Berkefeldt-Kieselguhrfilter gesaugt. Bei 5) war ausserdem auch noch die Rohrzuckerlösung im Autoklaven sterilisirt worden, und wurde die Mischung der beiden Flüssigkeiten unter allen aseptischen Vorsichtsmaassregeln vollzogen.

Es hat sich ergeben, dass die oben geschilderte Auspressmethode auch zur Gewinnung des Inhalts von Bacterienzellen geeignet ist, und sind Versuche darüber, namentlich auch mit pathogenen Bacterien, im hygienischen Institute zu München im Gang.

T ü b i n g e n , den 9. Januar 1897.

20. A. Bistrzycki und J. Flatau:

Die Condensation von Mandelsäure mit Phenolen. II.

(Eingegangen am 31. December.)

Wie bereits kurz mitgetheilt wurde ¹⁾, condensirt sich die Mandelsäure mit Phenol sehr leicht bei Gegenwart einer 73-procentigen Schwefelsäure ²⁾. Aus dem Reactionsproduct konnten wir früher nur eine Verbindung rein darstellen, die wir als *o*-Oxydiphenyllessigsäure-

lacton,
$$\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \underset{\text{CO} \cdot \text{O}}{\text{CH}} \cdot \text{C}_6\text{H}_4$$
, betrachteten. Die eingehendere Untersuchung

der Verbindung hat diese Auffassung vollkommen bestätigt und hat ferner zur Isolirung eines zweiten Reactionsproductes Veranlassung gegeben, in dem höchst wahrscheinlich die zu erwartende *p*-Oxydiphenyllessigsäure vorliegt.

Die Aufarbeitung des Rohproductes der Condensation haben wir erheblich verbessert und verfahren nunmehr folgendermaassen: Das (l. c.) angegebene Gemisch von (racem.) Mandelsäure, Phenol und Schwefelsäure wird unter öfterem Umschütteln langsam auf 125° erhitzt und nur 2--3 Minuten auf dieser Temperatur erhalten. Man kühlt nun den Kolbeninhalt — eine auf einer schwefelsauren Lösung schwimmende Oelschicht — ab und fügt eine etwa doppelt so grosse Gewichtsmenge Wasser hinzu, als man 73-procentige Schwefelsäure angewendet hatte.

Bei weiterem Abkühlen verwandelt sich jetzt das Oel in eine an der Kolbenwandung haftende, halbfeste Masse, von welcher die schwefelsaure wässrige Flüssigkeit abfiltrirt wird. Vom Filtrat (A) wird später noch die Rede sein.

¹⁾ Diese Berichte 28, 989.

²⁾ Es verdient hervorgehoben zu werden, dass die 73-procentige Schwefelsäure, welche sich als Condensationsmittel schon öfters bewährt hat (z. B. C. Liebermann, diese Berichte 29, 184), und welche in ihrer Wirkungsart sich von den Schwefelsäuren höherer Concentration bisweilen auffallend unterscheidet (Bistrzycki u. Oehlert, diese Berichte 27, 2632), die Zusammensetzung des Hydrates $\text{H}_2\text{SO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O} [= \text{S} \cdot \text{OH}]_6$ besitzt. Sie zeigt auch in physikalischer Hinsicht merkwürdige Eigenheiten; vergl. z. B. Kowalski, Rozprawy Akad. Krakowsky 1892.