

Über das Verhalten der Eiweißstoffe bei der alkoholischen Gärung.

Von

Leonid Iwanoff.

Mit einer Abbildung.

(Der Redaktion zugegangen am 27. Juli 1904.)

Seitdem die Hefezelle als die Ursache der Alkoholgärung erkannt worden ist, treffen wir viele Versuche an, welche bezwecken, diesen Prozeß mit dem stickstoffhaltigen Inhalt der Zelle in genetischen Zusammenhang zu bringen. Schon im Jahre 1803 fand Thénard¹⁾ in den Hefen «eine animalische Substanz» welche stickstoffhaltig war und beim Destillieren viel Ammoniak ergab. Die Zerspaltung des Zuckers war immer von einem allmählichen Verlust an dieser Substanz, die sich dabei in lösliche Produkte umwandelte, begleitet. Dasselbe bestätigte Mitscherlich,²⁾ welcher fand, daß der Stickstoffgehalt der Hefe während der Gärung in reinem Zucker von 10% bis 5% sank.

Im Jahre 1850 betrachtete Garreau³⁾ die Kohlensäureabgabe durch die Pflanzen direkt als eine Funktion ihres Stickstoffgehaltes und die Hefe, die gleichzeitig das stickstoffreichste und am stärksten Kohlensäure ausscheidende Objekt ist, als besten Beweis dafür. Diesen Gedanken wiederholte viel später Hayduck,⁴⁾ indem er einen Parallelismus zwischen N-Gehalt und der Gärungsintensität bei verschiedenen Hefen nachzuweisen suchte.

¹⁾ Schützenberger, Die Gärungserscheinungen, 1876, S. 31, 117.

²⁾ Ad. Mayer, Die Gärungschemie, 1902, S. 139.

³⁾ Garreau, Ann. d. Sciences naturelles, 1850, III^e série, T. 15, p. 5.

⁴⁾ Hayduck, Zeitschrift für Spiritusindustrie, 1881, Nr. 6, S. 85, Nr. 9, S. 173.

Noch weiter ging Liebig,¹⁾ der eine spontane Zersetzung oder Dissoziation der eiweißartigen Substanzen der Zelle behauptete, wodurch eine molekulare Bewegung entsteht, die auf den Zucker übergeht und denselben spaltet.

Die Bestätigung seiner Hypothese sah er darin, daß die Hefe Kohlensäure und Alkohol auch ohne Zucker auf Kosten der eigenen Substanz bildet. Diese letztere wird dadurch zerstört und da sie wegen des Zuckermangels nicht wieder aufgebaut werden kann, so werden ihre Spaltungsprodukte als lösliches Eiweiß und Leucin in die Flüssigkeit ausgeschieden.

Den Eiweißumsatz bei der Gärung nahm auch Pasteur²⁾ an, nur so zu sagen in einer anderen Richtung als Liebig.

Im Einklang mit seinen allgemeinen Anschauungen sah er in der Zuckerumwandlung nur einen Assimilationsprozeß, wodurch Cellulose, Fett und Eiweiß in der Hefe gebildet wird. Die Eiweißstoffe sollen nach ihm nicht durch ihre Zersetzung, sondern durch ihren Aufbau an der Gärung teilnehmen. Die Gärung ohne Stickstoffnahrung in reinem Zucker, die nach Liebig gegen diese Anschauung sprach, erklärte Pasteur auf folgende Weise: Die in Zuckerwasser gebrachte Bierhefe lebt auf Kosten des Zuckers und ihrer eigenen stickstoffhaltigen Substanz, die entweder löslich ist oder es werden kann durch die sich während der Gärung abspielenden Veränderungen. Daher besitzen die Hefen, denen die Stickstoffnahrung in Überfluß geboten wird, eine größere Aktivität und zersetzen mehr Zucker als dieselben Gewichtsmengen der Hefe, welche in einem an mineralischer und stickstoffhaltiger Nahrung armen Medium kultiviert werden.

Der von Thénard und Mitscherlich konstatierte Verlust des Stickstoffs bei der Gärung in reinem Zucker zeigte sich nach Pasteur nicht nur relativ, sondern absolut und konnte dadurch erklärt werden, daß die Hefe verschiedene stickstoffhaltige Materien enthält, deren eine durch die Hefe assimiliert wird, während die andere durch die inneren Veränderungen der Zelle gelöst wird und in die Flüssigkeit übergeht.

¹⁾ Liebig, Ann. d. Chemie und Pharm., 1870, Bd. CLIII, S. 1.

²⁾ Pasteur, Annales de Chimie et de Physiol., T. LVIII, p. 323.

Ad. Mayer¹⁾ erklärte später den von Pasteur konstatierten absoluten Stickstoffverlust dadurch, daß «der Hefepilz während seiner gärungserregenden Tätigkeit notwendig ein stickstoffhaltiges Exkrement ausscheidet, das ihm nicht, oder doch nur in sehr unvollkommenem Maße wieder als Nahrung dienen kann».

Die Anschauungen Nägelis²⁾ schließen sich teilweise der Theorie Liebig's an. Er fand, daß die Hefezellen bei der Gärung Eiweiß ausscheiden, und sah die Ursache hiervon in einer vermehrten Bewegung der kleinsten Teilchen, welche während der Gärtätigkeit die Verbände der Eiweißmicelle lösen und dadurch ihre Diosmose befördern. Wenn also Liebig in der Eiweißdissoziation die Ursache der Gärung sah, so erklärt Nägeli diese Dissoziation als eine notwendige Folge der Gärung.

In der Mitte der 70er Jahre nehmen die Gärungstheorien im Zusammenhang mit den Erfolgen in den Untersuchungen über den Eiweißumsatz eine bestimmtere Form an. Außerdem gibt die Entdeckung ähnlicher Prozesse, wie jener der intramolekularen Atmung, diesen eine allgemeinere Bedeutung. Von da ab wird die alkoholische Gärung als eine allgemeine Eigenschaft der Organismen betrachtet und einige bringen sie sogar in genetischen Zusammenhang mit der Sauerstoffatmung.³⁾ Deswegen werden auch die Anschauungen über den Mechanismus der letzteren, wie wir schon sehen werden, mit den Hypothesen über die alkoholische Gärung verknüpft.

Diese neuere Anschauungen über das Verhalten der Eiweißstoffe bei der Gärung hat Detmer⁴⁾ am klarsten formuliert. «Nach meiner Auffassung», sagt er, «kommen die gesamten Gärungserscheinungen, welche sowohl von höhern Pflanzen als auch von dem eigentlichen Hefepilze hervorgerufen werden, dadurch zustande, daß die stickstofffreien Dissoziationsprodukte der

¹⁾ Ad. Mayer, Die Gärungschemie, 1902, S. 140.

²⁾ Nägeli, Theorie der Gärung, 1879, S. 93—109.

³⁾ Pfeffer, Landwirtschaftl. Jahrbücher, 1878, Bd. VII, S. 817 ff.

Wortmann, Untersuch. an dem botan. Institut zu Würzburg, 1880, Bd. II, S. 500.

⁴⁾ Detmer, Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, 1883, S. 175.

physiologischen Elemente (lebendiger Eiweißmoleküle) bei Sauerstoffabschluß infolge der Bewegung ihrer Atome in Alkohol, Kohlensäure und andere Stoffe zerfallen. Der Fortgang der Gärung wird dadurch ermöglicht, daß die stickstoffhaltigen Zersetzungsprodukte der lebendigen Eiweißmoleküle sich wieder mit vorhandenen stickstofffreien Stoffen (Glukose) zur Bildung neuer physiologischer Elemente verbinden, die abermals zerfallen können.»

Hierfür meinte Detmer¹⁾ einen Beweis zu liefern, da er eine energische Eiweißzersetzung bei Lupinus-Keimlingen, die sich in Wasserstoffatmosphäre befanden, konstatieren konnte.

Nach meiner Meinung kann diese Tatsache mehr gegen, als für seine Hypothese sprechen. In der Tat war die Intensität der Eiweißzersetzung fast gleich derjenigen bei Sauerstoffzutritt, jedoch die Kohlensäureproduktion sank fast um das Doppelte²⁾

($\frac{I}{N} = 0,59$). Dies beweist, daß die Eiweißzersetzung bei der Keimung mit der Kohlensäureproduktion wenigstens zum Teil nichts zu tun hat und vielleicht nach Pfeffers Meinung hauptsächlich zu Transportzwecken dient.

Ebensowenig sprachen für die Eiweißtheorie die Untersuchungen von Diakonow³⁾ und Palladin.⁴⁾ Sie zeigten, daß die intramolekulare Atmung der Schimmelpilze und höheren Pflanzen sich nur bei Anwesenheit der Kohlenhydrate vollzieht und beim Fehlen dieser letzteren sofort aufhört. Erst dann zerspalten sich nach Palladin⁵⁾ die Eiweißstoffe, wenn die Pflanzen ihrer stickstofffreien Substanzen beraubt werden. Diese Tatsachen sprechen, wie wir sehen, so viel für, wie gegen die Eiweißtheorie der Gärung.

Mit der Buchnerschen Entdeckung der Zymase tritt die Frage in eine neue Phase ein. Man beginnt, auf die Mechanik der Gärung wie auf eine enzymatische Reaktion zu sehen, wo

¹⁾ Detmer, Bericht der deutschen botan. Gesellsch., 1892, S. 442.

²⁾ Detmer, Bericht der deutschen botan. Gesellsch., 1892, S. 201.

³⁾ Diakonow, Bericht der botan. Gesellsch., Bd. V, 1887, S. 115.

⁴⁾ Palladin, *Revue générale de Botan.*, T. 6, 1894, p. 201.

⁵⁾ Palladin, Bericht der botan. Gesellsch., Bd. 6, 1888, S. 205.

die Eiweißstoffe nur als Enzyme eine Rolle spielen. Aber man muß gestehen, daß in dieser Richtung noch recht wenig getan wird. Buchner¹⁾ selbst sagt nämlich: «Bezüglich des Mechanismus des Gärungsvorganges ist allerdings der in der Zymase-entdeckung begründete Fortschritt zunächst kein großer. Denn über die Art, wie das Enzym entsteht, über die Mittel, durch die es etwa den Zucker spaltet, mit Hilfe welcher Zwischenreaktionen usw., fehlt uns fast jede Vorstellung.» Folglich bleibt es noch fraglich, ob die Eiweißspaltung überhaupt stattfindet und, wenn das der Fall ist, ob sie als eine Zwischenreaktion der Zuckerspaltung selbst zu betrachten ist, oder ob sie an der Produktion der zuckerspaltenden Enzyme teilnimmt. Buchner gibt nur einen Versuch, welcher gegen die Beteiligung der Eiweißzersetzung in der Gärung selbst spricht und die Wirkungsweise der Zymase mit derjenigen der anderen Enzyme vergleichbar machen soll. Die Wirkungsweise der Enzyme wird bekanntlich dadurch charakterisiert, daß sich diese Stoffe an der Reaktion scheinbar nicht beteiligen und durch verschwindend kleine Mengen quantitativ unverhältnismäßig große Umsetzungen zustande bringen. Der Versuch aber, der dies für die Zymase beweisen soll, scheint jedoch sehr bedenklich zu sein.²⁾ Je 50 ccm frischer Preßsaft wurden in 200 ccm Spirit von 96% (Versuch A) bzw. 600 ccm Spirit (B) eingetragen, es resultierten je 6,7 g getrockneter Fällung. Beide Niederschläge wurden in 45 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von Thymol und 8 g Rohrzucker zu 20 ccm dieser Lösung die Gärkraft bestimmt. Diese war doppelt so groß bei B (Fällung durch viel Spirit) als bei A (Fällung durch wenig Spirit). Der erstere Niederschlag enthielt also nach Buchners Meinung ungefähr zweimal soviel Zymase als der letztere; trotzdem zeigten beide Niederschläge dasselbe Gewicht. Nun ist es aber äußerst fraglich, ob die Fällung B mehr Zymase als A enthält. Denn es gelang dem Autor selbst bei Zusatz von Äther nicht, aus dem Filtrat jener Fällung A (durch wenig Spirit) noch weiter gärwirksame Substanz niederzuschlagen. Daher bleibt die Erklärung durch un-

¹⁾ Buchner, Die Zymasegärung, 1903, S. 23.

²⁾ Buchner, Die Zymasegärung, S. 236.

vollständige Fällung ganz unbewiesen und es ist viel wahrscheinlicher, daß die Zymase wie die Hefezelle gegen verdünnten Alkohol viel empfindlicher ist als gegen konzentrierteren, daß also nicht ein Verlust der Quantität der Probe B, sondern in ihrer Qualität anzunehmen ist. Denn bei der Fällung A betrug der Alkoholgehalt der Mischung (Preßsaft + Alkohol) ungefähr 75 % und bei B 90 %; gerade die erste Konzentration tötet die lebende Zelle sehr schnell, während die Hefezellen in der zweiten 2 Tage lebendig bleiben.¹⁾ Daher blieb es ganz unentschieden, was in dem Gemenge von Eiweißstoffen, welches die Präparate Zymase und Zymin darstellen, bei der Gärung geschah.²⁾

Schließlich erschienen neulich die Untersuchungen von Herlitzka,³⁾ nach welchen die Zymase mit dem Nucleohiston identisch ist. Wenn wir aber seine Beobachtungen über die Spaltung des Zuckers durch die Präparate des Nucleohistons als vollständig bewiesen annehmen, so bleibt dann sogar folgender Einwand dagegen bestehen, welchen Cohnheim ausgesprochen hat. «Wir können nie wissen», sagt er, «ob die betreffenden, von uns isolierten Eiweißkörper die Träger der Funktion sind, die wir an ihnen beobachten, oder beigemengte Fermente und Ähnliches.⁴⁾ Daher blieb es auch nach den Untersuchungen Herlitzkas unentschieden, was für eine Rolle das Nucleohiston bei der Gärung spielt.

¹⁾ Kurzwelly, Jahrbuch für wissenschaftl. Botan., Bd. XXXVIII. Nach den Untersuchungen von Kurzwelly scheint es, daß die Hefezellen sogar widerstandsfähiger gegen Alkohol sind als die Zymase. Sie ertragen eine 2—3 tägige Wirkung des absoluten oder 90 %igen Alkohols, Äthers, Benzols, Schwefelwasserstoffs in luft- oder exsikkatortrockenem Zustande. Dies spricht natürlich nicht gegen die Zymasetheorie, sondern sagt bloß, daß die lebende Hefezelle widerstandsfähiger gegen nachteilige Einflüsse ist als einige aus ihr isolierte Stoffe.

²⁾ Wenn die alkoholische Gärung nach Herzog der Gleichung der Invertinwirkung gehorcht, so ist es nicht zu sagen, was für Prozesse durch eine solche Gleichung ausgedrückt werden. Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 149; Bd. XLI, S. 416.

³⁾ Herlitzka, Archives italiennes de biologie, T. XXXIX, 1903, p. 416. Archivio di fisiologia, Vol. I, 1904, p. 220.

⁴⁾ Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, 1900, S. 202.

Das eben Dargelegte zeigt, daß alle Autoren, welche über Gärung arbeiteten, annahmen, daß die Eiweißstoffe irgend welche, vermutlich sehr wichtige Rolle in dem Gärungsprozesse spielen.

Trotzdem fehlte merkwürdigerweise die Untersuchung des quantitativen Verhaltens der Eiweißstoffe bei diesem Prozesse vollständig. Was mit diesen wichtigen Stoffen bei der Zuckersersetzung geschieht, ob sie intakt bleiben oder zerspalten, resp. neu gebildet werden, blieb ganz unentschieden; und so bestand zunächst meine Aufgabe darin, diese Lücke durch folgende Versuche auszufüllen.

Um die Gärung möglichst von anderen Prozessen abgetrennt beobachten zu können, wurden alle diese Versuche in reinem Zucker ohne andere Nährstoffe ausgeführt.

Versuch I.

125 g käufliche Preßhefe wurden in 700 ccm Leitungswasser durch Schütteln möglichst gleichmäßig verteilt. Dann wurden 4 Proben von je 25 ccm dieser Mischung mit 1,5 g Trockengewicht zur Bestimmung des Eiweißstickstoffes genommen. Die eine Hälfte der Proben wurde sofort, die andere erst nach Vergärung von 3,5 g Glukose während 22 Stunden analysiert.

Bei der Eiweißstickstoffbestimmung wurde der Probeninhalt¹⁾ bis zu 100 ccm mit Wasser verdünnt und dann auf dem Wasserbade mit Kupferoxyd nach Stutzer gefällt.

Im Niederschlage wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Beim Verbrennen mit konzentrierter Schwefelsäure benutzte ich Quecksilber zur Beschleunigung der Reaktion.

Beim Abdestillieren des Ammoniaks verwandte ich Zinkpulver zur Erleichterung des Kochens der Natronlauge und destillierte dann ohne Wasserkühler, was nach einigen Kontrollversuchen keine merkliche Änderung in der Bestimmung mit

¹⁾ Die Prüfung der Flüssigkeit nach dem Abfiltrieren von der Hefe gab in keinem Falle eine Reaktion auf Eiweißstoffe; es gehörte daher der ganze Eiweißstickstoff nur den Hefen an und das Abfiltrieren der Gärungsflüssigkeit von der Hefe war in diesem Falle ganz unnötig.

sich bringt. Beim Filtrieren mit Natronlauge ($1/10$ N) benutzte ich Metylorange als Indikator.

Die Resultate zeigt folgende Tabelle:

	1,5 g Trockenhefe enthält in mg	
	Vor der Gärung	Nach der Gärung
Gesamt-N	83,3	
Eiweiß-N	a) 80,5 b) 80,2	80,8 81,7
	80,35 } 81,12	

Dieser Versuch zeigt, daß die Eiweißstoffe fast keine quantitative Änderung bei der Gärung erlitten, obwohl eine kleine Menge des Nichtproteinstickstoffs als Material zur Eiweißregeneration zur Verfügung stand.

Im nächsten Versuche ließ ich die Hefe eine viel größere Gärungsarbeit leisten, indem ich auf dasselbe Gewicht der Hefe eine viel größere Menge Zucker gab.

Versuch II.

20 g reiner Brennereihefe¹⁾ wurden mit 400 ccm Leitungswasser geschüttelt und 8 Proben von je 25 ccm mit 0,3445 g Trockengewicht genommen.

Die eine Hälfte davon wurde sofort wie im vorhergegangenen Versuche analysiert, die andere erst nach Vergärung von 15 g Rohrzucker bei 25° während 4 Tagen. Die Menge der inzwischen ausgeschiedenen Kohlensäure, welche durch die Wägung bestimmt wurde, betrug 3 g, wonach die Menge des vergorenen Zuckers mit beinahe 6 g berechnet wird. Die Analyse ergab folgende Resultate:

	0,3445 g Trockenhefe enthält in mg	
	Vor der Gärung	Nach der Gärung
Gesamt-N	27,4	
Eiweiß-N	a) 25,20 b) 25,20	25,38 25,06
	25,20 } 25,22	

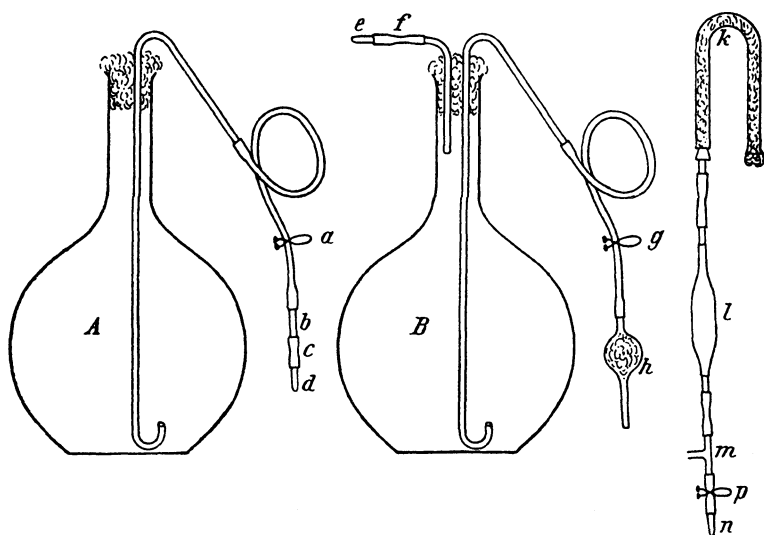
¹⁾ Diese Hefe habe ich vom Berliner Institut für Gärungsgewerbe erhalten, wofür ich Herrn Prof. Dr. Lindner meinen Dank ausspreche.

In diesem Versuche, wie im vorhergegangenen, bleibt die Eiweißmenge ganz unverändert, obwohl die Hefe eine viel größere Gewichtsmenge des Zuckers vergären mußte.

Merkwürdigerweise beobachteten wir auch keine Synthese der Eiweißstoffe auf Kosten der nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen, deren Menge beinahe 8% des Gesamtstickstoffs betrug. Die Anwesenheit dieser zur Eiweißsynthese unfähigen Stoffe zeigte sich in dem nächsten Versuche noch deutlicher.

Versuch III.

Dieser Versuch wurde mit einer reinen Kultur Brennereihefe N 128 von Král unter sterilen Bedingungen auf folgende Weise ausgeführt:



In den Kolben A von 5 l Inhalt wurden 4 l der verdünnten (8,5% Balling) Bierwürze eingegossen und dann die Öffnung mittels eines Wattepfropfens dicht verschlossen. Durch den Pfropfen wird ein Glasrohr eingeführt, welches gekrümmt ist, wie die Zeichnung zeigt. Die Krümmung am unteren Ende dient dazu, um das Mitreißen des Niederschlages durch die ausfließende Flüssigkeit möglichst zu vermeiden. Auf das andere

Ende des Rohres wurde ein langer, mit dem Quetschhahn a versehener Gummischlauch aufgesetzt, welcher mit dem kurzen Röhrchen b, dem Gummiansatz c und dem Glasstöpsel d endigt.

Vor dem Sterilisieren wurde die Röhre mit Würze mittels Aufsaugers gefüllt, und auf solche Weise konnte sie nachher als Heber dienen.

Der Kolben wurde 3 mal im Dampfsterilisator je 3 Stunden erwärmt und die Würze nach dem Abkühlen in einen andern Kolben B übergeführt. Dieser hatte auch 5 l Inhalt und besaß ebenfalls einen Wattepfropfen, durch welchen 2 Glasröhren gingen, eine kurze mit Gummischlauchansatz f und Glasstöpsel e und eine längere, welche ganz wie die für den Kolben A beschriebene gekrümmt ist und mit dem Watterohr h geschlossen wurde. Dieser zweite Kolben wurde auch 3 mal im Dampfsterilisator sterilisiert und dann mit steriler Würze aus dem Kolben A gefüllt. Dabei wurde der Gummiansatz f des Kolbens B mit dem Röhrchen b des langen, durch einen Quetschhahn geschlossenen Gummischlauches des Kolbens A unter den für sterile Arbeit üblichen Vorsichtsmaßregeln verbunden. Hierauf wurde der Kolben A bedeutend höher als B gestellt, der Quetschhahn A geöffnet und die Würze vorsichtig unter Regulation durch den Quetschhahn, ohne den sich stets bei Sterilisation bildenden Niederschlag im Kolben A zu berühren, in den Kolben B übergeleitet. Dann wurde Rohr f von dem Rohr b getrennt und mit dem Glasstöpsel e abgeschlossen. Der Kolben A diente weiter zur Sterilisation des Wassers, während der Kolben B einige Zeit unter öfterem Schütteln in kühlem Raume aufbewahrt wurde. Inzwischen wurde ein mit derselben Würze gefüllter Pasteurscher Kolben von $\frac{1}{4}$ l Inhalt mit einer reinen Kultur der Brennereihefe N 128 von Král geimpft und, als die Gärung in vollem Gange war, mit dem Rohre f des Kolbens B verbunden und sein Inhalt unter Schütteln übergeleitet. Die Gärung ging bei Zimmertemperatur unter Durchleiten eines Luftstroms durch das Watterohr h und das lange Rohr vor sich. Nach 3 Tagen war die Hauptgärung beendet und der Kolben wurde im Keller bei 10° C. aufbewahrt, wo sich die Hefe nach 24 Stunden vollständig zu Boden gesetzt hatte.

Dann wurde die vergorene Flüssigkeit durch das lange Rohr möglichst vollständig abgelassen und durch das Rohr f steriles Wasser aus dem Kolben A, grade so wie früher sterile Würze, hineingeleitet, mit den abgesetzten Hefen geschüttelt und wieder zum Absetzen hingestellt. Nach einigen Stunden wurde das Waschwasser wieder abgelassen und darauf noch 3 Liter zugegossen. Nach dem letzten Absetzen wurde so viel abgelassen, das in dem Kolben nur 1 l Flüssigkeit mit Hefen zurückblieb.

Um diese Hefemischung in gleichmäßigen Proben zu erhalten, wurde folgende Einrichtung benutzt: Eine Pipette, in welcher ein bestimmtes Volumen (25 ccm) mittels 2 Marken gekennzeichnet war, wurde mittels Gummischlauches oben mit dem Watte-U-Rohr k, unten mit einem Schenkelrohr m, welches in das zugespitzte Röhrchen n endigte, in Verbindung gesetzt. Alle obengenannten Glasteile wurden zunächst mit durch Watte zugestopften Öffnungen im Trockenschrank bei 150° sterilisiert und dann durch sterilisierte Gummiröhrchen unter einander, und schließlich mittels Schenkel m mit dem langen Gummischlauch des Kolbens B in Verbindung gesetzt.

Dann wurde der Kolben B so hoch gestellt, daß sich sein Bodenniveau etwas höher als die obere Marke der Pipette befand, das lange Gummrohr, mit einem Quetschhahn g versehen und dieser letztere nach dem Schütteln des Kolbens geöffnet. Nach Füllung der Pipette bis zur oberen Marke wurde der Quetschhahn g geschlossen und darauf der Quetschhahn p geöffnet und die Flüssigkeit nach Entfernung des Wattestöpsels aus der Öffnung bis zur unteren Marke in den sterilen Erlenmeyer-Kolben abgelassen.

Die ersten Portionen wurden natürlich nicht benutzt, alle übrigen enthielten durchschnittlich 0,5088 g Trockenhefe in 25 ccm Flüssigkeit und waren vollständig steril.¹⁾

Der eine Teil dieser Proben wurde sofort analysiert, zu

¹⁾ Diese Proben benutzte ich auch zu Hungerversuchen, welche ich in meiner Arbeit über die Umwandlungen der Phosphate in der Pflanze beschreibe. Nach wochenlangem Verweilen im Thermostaten waren die Kulturen vollständig rein.

den anderen wurde zunächst 5 g (5 ccm der sterilen 100%igen Lösung) Glukose hinzugefügt. Nach 48stündiger Gärung bei 25° wurden nochmals 5 g Glukose hinzugefügt und die Proben nach weiteren 24 Stunden analysiert.

Die folgende Tabelle zeigt die erhaltenen Resultate:

	0,5088 g Trockenhefe enthielt in mg	
	Vor der Gärung	Nach der Gärung
Gesamt-N	37,45	
Eiweiß-N	a) 30,5	31,9
	b) 31,5	30,1
	31,01	31,01

Durch diesen Versuch ist also bewiesen, daß der Mangel an Sterilität keinen Einfluß auf die von uns früher erhaltenen Resultate hatte: die Eiweißzerspaltung macht sich bei der Gärung nicht bemerklich. Merkwürdigerweise beobachten wir auch keine Eiweißsynthese, obwohl die Menge des Nichtproteinstickstoffes beinahe 14% des Gesamtstickstoffes betrug.

Diese Verbindungen sind offenbar unfähig, sich in Eiweiß zu verwandeln, weil die Hefe selbst die Fähigkeit, das Eiweiß aus Asparagin zu synthetisieren, in vollem Maße unter diesen Bedingungen behielt, wie der nächste Versuch beweist.

Versuch IV.

Zu einigen Proben der im vorigen Versuche abgelassenen Hefe wurden je 10 g Glukose mit 0,25 g Asparagin zugefügt und nach 3 und 5 Tagen der Eiweißstickstoff bestimmt. Die Tabelle zeigt, daß die Eiweißsynthese ganz gut vor sich ging.

	0,5088 g Trockenhefe enthielt in mg		
	Vor der Gärung	Nach der Gärung mit Zucker und Asparagin	
		nach 3 Tagen	nach 5 Tagen
Eiweiß-N	a) 30,5	41,86	46,76
	b) 31,5	42,00	
	31,01	41,93	

Dadurch ist bewiesen, daß die Hefe nicht alle Stickstoffverbindungen, welche sich beim Stoffwechsel in den Zellen ansammeln, in Eiweißstoffe umwandeln kann. Was für Verbindungen diese nicht umwandelbaren Stoffe sind, ob sie Zerspaltungsprodukte der Eiweißstoffe selbst sind, bleibt einstweilen unentschieden.

Hier will ich nur bemerken, daß sie bei der Fällung mit Kupferoxyd das Filtrat als Kupferverbindungen blau färben, gerade wie es bei Eiweißzerspaltungsprodukten geschieht.

Hieraus ergibt sich die Frage, ob die ganze Menge der Eiweißzersetzungsprodukte vollständig assimiliert und in Eiweiß regeneriert werden kann. Bisher nahm man das letztere als Ausfluß des Dogmas von der Omnipotenz des Eiweißes an, es fehlen jedoch hierfür irgendwelche beweisenden Tatsachen. Da aber die Entscheidung der Frage, ob die Eiweißstoffe bei der Gärung ein tatsächliches Konstantbleiben oder nur ein Gleichgewicht zwischen Spaltung und Synthese zeigen, davon abhängt, ob die Eiweißsynthese alle Zersetzungsprodukte regenerieren kann, so habe ich versucht, diese Frage experimentell zu erörtern.

Versuch V.

Ein Teil der Portionen von steriler Hefe, die in der Kultur des Versuchs III erhalten wurden, wurde in die Erlenmeyer-Kolben mit einer Bodenfläche von 75 qcm gebracht. Jede Portion, die, wie schon gesagt, 25 ccm Wasser und 0,5088 g Trockenhefe enthielt, wurde 21 Tage ohne Zusatz von Nährstoffen aufbewahrt. Die Analyse zeigte zu dieser Zeit, daß die Eiweißstickstoffmenge von 31,01 mg bis 25,48 mg gesunken und Nichtproteinstickstoff von 5,44 mg bis 10,97 mg hinzugekommen war. Dann wurden 10 ccm von steriler 100%iger Glukose-lösung hinzugefügt und nach 4tägiger Gärung bei 25° die Analyse ausgeführt. Es wurden 28,14 mg von Eiweißstickstoff und 8,8 mg Nichtproteinstickstoff gefunden.

Also konnte die Hefe nur 40% der Eiweißzerspaltungsprodukte, die beim Hungern entstanden waren, ausnutzen.

Versuch VI.

Die sterile Hefe wurde auf dieselbe Weise wie in Versuch III von derselben Kultur N 128 Lindner erhalten. Die Kulturflüssigkeit hatte folgende Zusammensetzung:

4000 g	Leitungswasser
550	» Saccharose
75	» «Witte»-Pepton
70	» KH_2PO_4
3	» MgSO_4

Diese Lösung wurde 3 Tage nacheinander je $1\frac{1}{2}$ Stunde im Dampfapparat sterilisiert, dann in einen sterilen Kulturkolben übergeführt und dort mit Hefe geimpft.

Nach 7tägiger Gärung bei Zimmertemperatur blieb der Kulturkolben einen Tag bei 10° stehen, wodurch sich die Hefe absetzte. Nach 2maligem Auswaschen mit kaltem (10°) Wasser und Absetzen wurde die geschüttelte Hefe, wie schon früher beschrieben, in Erlenmeyer-Kolben mit 75 qcm Bodenfläche verteilt.

Das eine Paar Kolben wurde sofort analysiert, das andere erst, nachdem es 3 Tage ohne Nahrungszusatz bei 25° gestanden hatte.

Die Analyse zeigte, daß jede Portion mit 0,167 g Trockenhefe folgende Menge Eiweißstickstoff in Milligramm enthielt:

Vor dem Hungern	a) 9,8	9,75
	b) 9,7	
Nach » »	a) 6,0	5,85
	b) 5,7	

Also wurden beinahe 40% des Eiweißstickstoffs beim Hungern in Nichtproteinstickstoff umgewandelt.

Dann wurden zu 6 solcher Proben je 10 ccm der sterilen 50%igen Glukoselösung zugesetzt und nach einer Woche zeigte die Analyse von 2 derartigen Proben, daß der Eiweißstickstoff in einer Probe 8,4, in der anderen 8,2 mg betrug. Das heißt 60% der Eiweißzersetzungsprodukte wurden wieder in Eiweiß regeneriert. Eine vollkommenere Ausnutzung derselben konnte ich nicht erreichen.

Nach einer Woche nämlich begann wieder eine Eiweißabnahme, da die Analyse zu diesem Zeitpunkt 7,5 mg Eiweiß-

stickstoff zeigte. Das nochmalge Hinzufügen von 10 ccm 50%iger Glukoselösung rief nach einer Woche wieder eine kleine Zunahme des Eiweißstickstoffes bis 7,7 event. 8,1 mg hervor. Nach einer Woche sank derselbe nochmals bis auf 5,74 mg.

Diese Versuche zeigen, daß die Hefe in reinem Zucker nur 40—60% der Zerspaltungsprodukte wieder in Eiweiß zu regenerieren imstande ist und daß daher die Eiweißzersetzung nie unter diesen Bedingungen durch Synthese verdeckt werden kann.¹⁾

Dieses Resultat stimmt mit den Untersuchungen Schulzes,²⁾ der bewies, daß bei dem Eiweißzerfall nicht Asparagin (event. Glutamin) und Kohlenhydrat, wie man früher meinte,³⁾ sondern eine ganze Menge von verschiedenen stickstoffhaltigen Produkten entsteht, die für die Eiweißneubildung nicht gleichwertig sind. Daher verliert die Annahme der Eiweißtheorie, daß eine dauernde Zertrümmerung und Neubildung von Eiweiß ohne Anhäufung der Zerspaltungsprodukte bei Anwesenheit von Kohlenhydraten möglich sei, jeden experimentellen Beweis.

Wir können also sagen, daß das Konstantbleiben der Eiweißstoffe bei der Gärung in reinem Zucker sehr wahrscheinlich kein Gleichgewicht der entgegengesetzten Prozesse ist. Bei gleichzeitig nebeneinander verlaufender Synthese und Zersetzung in reinem Zucker müssen sich immer die nicht verwendbaren Produkte ansammeln.

Ich bin weit davon entfernt, aus diesen Versuchen einen endgültigen Schluß zu ziehen. Die folgenden Versuche geben mehr Veranlassung dazu, jedoch ermöglichen diese vorläufig

¹⁾ Die Versuche Prianischnikoffs über die bei Lichtzutritt erfolgende Regeneration der Eiweißzersetzungsprodukte höherer Pflanzen ermöglichen, denselben Schluß zu ziehen. Berechnen wir diese Versuche in derselben Art, wie unsere früher für Hefe mitgeteilten, so zeigt sich, daß *Pisum sativum* und *Phaseolus multiflorus* nicht mehr als 65% der Zersetzungsprodukte am Licht, d. h. bei Kohlenhydratenzufuhr regenerieren können. Siehe Prianischnikoff, Die Eiweißstoffe und deren Umsatz im Pflanzenorganismus, Moskau, 1899 (russisch).

²⁾ Schulze, Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, 1897, S. 18.

³⁾ Pfeffer, Jahrbücher für wissenschaft. Botan., Bd. 8, 1872, S. 429. Borodin, Bot. Zeit., 1878, S. 801.

eine Erklärung des Widerspruches, in welchem unsere Versuche mit den Angaben früherer Autoren über den bei der Gärung in reinem Zucker stattfindenden Stickstoffverlust stehen.

Wir haben schon gesehen, daß Mitscherlich, Ténard, Pasteur, Liebig, Nägeli¹⁾ und weiter Ducleaux,²⁾ Schützenberger und Destrem,³⁾ alle eine Stickstoffausscheidung aus der Hefe bei Gärung in reinem Zucker beobachteten.

Diese Tatsache kann durch zwei Umstände erklärt werden: erstens wurden alle früheren Versuche mit nicht steriler Hefe ausgeführt und zweitens dauerten sie zu lange. Bei Anwesenheit der Bakterien wurde natürlich das Absterben und Zersetzen einzelner Hefezellen beschleunigt und die dadurch entstandenen Zersetzungsprodukte, ohne vollständig durch die lebenden Zellen regeneriert werden zu können, mehr und mehr in der Gärungsflüssigkeit angesammelt.

Dasselbe beobachtete ich an der wochenlang dauernden Kultur von Versuch VI. Die Hefen, die eine Woche nach Ende der Gärung bei 25° standen, zeigten schon eine Abnahme des Eiweißstickstoffes, in einem Falle von 8,2 bis 7,5 mg und in anderen Fällen von 7,9 bis 5,74 mg.

In einigen Versuchen von Schützenberger und Destrem (l. c.), welche nur 24 Stunden dauerten, fand sich eine sehr unbedeutende Stickstoffabnahme von 2,81 bis 2,70%, die schon in den Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode liegt.

Also hat das sogenannte «Erschöpfen» der Hefe bei lange dauernder Gärung in reinem Zucker mit dem Stickstoffverlust nichts zu tun. In solchen Fällen, wo sich dieses nicht durch das Absterben der Zellen erklären läßt, haben wir es mit einer physiologischen Reaktion zu tun, die dem Ruhestadium entspricht und sehr wahrscheinlich durch

¹⁾ Nägeli (s. oben) fand merkwürdigerweise dabei, daß der Stickstoff in Form von Albumin oder Pepton ausgeschieden wird. Ich konnte in keiner, sogar nicht einmal in unreinen Kulturen eine Biuretreaktion der Gärungsflüssigkeit beobachten. Außerdem fanden Hahn und Geret bei Selbstverdauung von Hefe nur Spuren von Albumosen und kein Pepton. Siehe Die Zymasegärung, S. 307.

²⁾ Traité de Microbiologie, T. III, p. 206—210.

³⁾ Traité de Microbiologie, T. III, p. 323—327.

Veränderung des Enzymgehaltes oder das Entstehen von Stoffen, welche die Gärung hemmen, erklärt werden kann.

Ich gehe jetzt zu den Versuchen über, welche nach meiner Meinung entschiedener für unsere Interpretation des beobachteten Konstantbleibens der Eiweißstoffe und folglich gegen die Dissoziationshypothese sprechen.

Die letztere sagt, daß sich die Zersetzung der Eiweißmoleküle unaufhörlich fortsetzt, aber nur beim Mangel des Kohlenhydrates, d. h. des Materials für die Eiweißsynthese wahrnehmen läßt.

Diesem Standpunkte entsprechend ändert das Kohlenhydrat nur die Bedingungen der Eiweißregeneration, indem es das Material dazu gibt, läßt aber die Bedingungen der Eiweißzersetzung ganz unverändert.

Jetzt können wir annehmen, daß die wesentlichste Bedingung der Eiweißzersetzung in der Zelle ein proteolytisches Enzym ist, welches seine Arbeit in der in bestimmter Weise zerstörten Zelle fortsetzt und sich bei der sogenannten Selbstverdauung bemerkbar macht. Im Gegenteil hierzu hört die Eiweißsynthese sofort nach dem Tode der Zelle als Ganzes auf.

Wenn also das Kohlenhydrat nur auf den Gang der Eiweißsynthese einen Einfluß hätte und die Bedingungen der Eiweißzersetzung gar nicht änderte, dann müßte der Eiweißzerfall nach dem Tode ganz unverändert weiter gehen, gleichviel ob Kohlenhydrat vorhanden ist oder nicht. In der Tat hat aber das Kohlenhydrat einen großen Einfluß auf die Eiweißzersetzung.

Die unten beschriebenen Versuche zeigen, daß die eben gärende Hefe und die nicht gärende sich bei Selbstverdauung ganz anders verhalten.

Versuch VII.

33 g Preßhefe wurden mit 300 ccm 20%iger Saccharose gemischt und nach 24stündiger Gärung, als die Kohlensäureausscheidung noch nicht aufgehört hatte, wurde die Gärungsflüssigkeit von der teilweise abgesetzten Hefe abgegossen und von der zurückbleibenden breiartigen Hefenmasse wurden einige Proben zu 10 ccm mit der Pipette unter Schütteln weggenommen.

Gleichzeitig wurde dieselbe, aber noch nicht gegorene Hefe mit Wasser ungefähr in dieselbe breiartige Masse zerrieben und davon Proben zu je 10 ccm genommen. Beide Reihen von Proben wurden mit Thymol im Überschuß in dem Thermostaten bei 50° erhitzt und nach 2 Stunden, als die mikroskopische Untersuchung mit Methylenblau zeigte, daß alle Zellen sofort tiefblau gefärbt und folglich tot waren, dann bei 47° C., d. h. beim Optimum für Hefeproteolyse weiter aufbewahrt.

Nach 15 und 64 Stunden wurden die Proben von beiden Reihen analysiert und der Eiweißgehalt mit folgenden Zahlen ¹⁾ bezeichnet:

	Vor Selbstverdauung	Bei Selbstverdauung	
		nach 15 Stunden	nach 64 Stunden
Gegorene Hefe	a) 55,0 } b) 55,0 }	36,6	21,4
Nicht „ „	a) 53,0 } b) 54,0 }	19,4	10,9

Der Unterschied in der Proteolyse gegorener und nicht gegorener Hefe wird vielleicht noch klarer, wenn wir zeigen, wieviel Prozente Eiweißstoffe von der Anfangsmenge derselben zerlegt wurden:

	Bei Selbstverdauung	
	nach 15 Stunden	nach 64 Stunden
Gegorene Hefe	33 %	61,4 %
Nicht „ „	65 %	80,0 %

Diese Zahlen zeigen, daß die Vergärung des Zuckers einen entschieden hemmenden Einfluß auf die Eiweiß-

¹⁾ Für meine Ziele genügen nur relative Werte, daher bedeuten sämtliche Zahlen dieser und der folgenden Tabellen eigentlich die Anzahl der Kubikzentimeter der $\frac{1}{10}$ -N.-Schwefelsäure, welche für die Neutralisation des Ammoniaks verbraucht wurden, den man nach der Stutzer-Kjeldahlschen Methode der Eiweißbestimmung erhält. Um die Eiweißstickstoffmenge daraus zu berechnen, hat man diese Zahlen nur mit 1,4 zu multiplizieren.

zersetzung in der Hefe ausübt: die Eiweißstoffe der gegorenen Hefe zersetzen sich halb so stark wie die nicht gegorene.

Diesen Einfluß des vergorenen Zuckers¹⁾ auf die nachfolgende Selbstverdauung kann man durch folgende 3 Möglichkeiten erklären. Erstens kann man voraussetzen, daß die Eiweißstoffe bei der Gärung durch eigenartige Veränderungen viel beständiger gegen das proteolytische Enzym geworden sind. Zweitens ist es möglich, daß die Menge des proteolytischen Enzyms bei der Gärung abnimmt und drittens, daß dabei die Proteolyse hemmende Substanzen oder antiproteolytische Enzyme gebildet wurden.

Um zu entscheiden, welche von diesen Möglichkeiten der Wirklichkeit entspricht, wurde in dem eben mitgeteilten Versuche eine gegorene Probe mit einer nicht gegorenen (nach Abtötung bei 50° mit Thymol) zusammengegossen und mit den anderen Proben 64 Stunden bei 47° aufbewahrt. Wenn die Selbstverdauung der gegorenen und nicht gegorenen Probe ganz selbständig vor sich ging, dann sollte die Analyse die Summe der Eiweißstoffe der getrennt verdauenden Proben zeigen. Aber dies war nicht der Fall. In der Tat habe ich anstatt $21,4 + 10,9 = 32,4$ viel mehr, nämlich 42,0 Einheiten von Eiweißstoffen bekommen.

Es zeigte sich, daß die gegorenen Hefen die Proteolyse der nicht gegorenen verzögern können und daß folglich antiproteolytische Substanzen bei der Gärung gebildet werden. Die nächsten Versuche bestätigten das vollständig.

Versuch VIII.

Es wurden 40 g Preßhefe mit 450 ccm Leitungswasser geschüttelt und von dieser Mischung die Proben zu je 25 ccm genommen. Zu jeder Probe wurden je 10 ccm 50%iger Saccharoselösung hinzugefügt und bei Zimmertemperatur in Gärung versetzt. Die restierende Menge von Hefemischung

¹⁾ Der Zucker selbst wirkt nur in sehr starken Konzentrationen (30—40%) auf die Proteolyse hemmend. Siehe Buchner, Die Zymasegärung, S. 316. In meinen Versuchen blieben in der Gärungsflüssigkeit nur kleine Zuckermengen, welche natürlich keinen Einfluß ausüben konnten und auch in der Tat, wie wir weiter sehen werden, keinen ausübten.

wurde bei 3—4° C. stehen gelassen, um die Eiweißzersetzung zu vermeiden, und nach 24 Stunden wieder Proben zu je 25 ccm davon genommen.

Diese enthielten, wie die Analyse zeigte, dieselbe Eiweißmenge wie die am vorhergehenden Tage in Gärung versetzten Proben, bei denen jetzt die Gärung schon ihr Ende erreicht hatte. Dann wurde zu allen Proben Chloroform im Überschuß hinzugefügt und alle bei 33° C. aufbewahrt. Nach 4 Stunden, als die Färbung mit Methylenblau unter dem Mikroskop das Absterben sämtlicher Zellen zeigte, wurden 2 Paare der gegorenen und nicht gegorenen Proben zusammengegossen, nochmals mit Chloroform im Überschuß versetzt und mit anderen bei 32° C. stehen gelassen. Die Proben von diesen 3 Serien wurden nach 1, 2 und 5 Tagen analysiert und die Tabelle zeigte die dabei zurückgebliebene Eiweißstoffmenge.

	Vor Selbst- verdauung	Nach Selbstverdauung		
		nach 24 Stunden	nach 48 Stunden	nach 120 Stunden
Gegorene Probe . . .	32,9	32,4	30,6	26,0
Nicht » » . . .	31,8	24,6	22,4	9,8
Summe	64,7	57,0	53,0	35,8
Gegorene und nicht ge- gorene Probe	64,7	59,0	52,3	43,8

oder die Menge des zerfallenen Eiweißstoffes in Prozenten der Anfangsmenge:

	Nach Selbstverdauung		
	24 Stunden	48 Stunden	120 Stunden
Gegorene Probe . .	1,2	7,0	27,0
Nicht » » . .	22,3	30,0	70,0
Gegorene und nicht ge- gorene Probe	8,8	18,0	32,0

Diese Zahlen zeigen sehr anschaulich, wie viel schneller sich die Proteolyse der nicht gegorenen Proben vollzieht. Weiter

sehen wir, inwiefern die gegorene Probe die Selbstverdauung der nichtgegorenen erniedrigt. Nach 5 Tagen war das Resultat der Enzymarbeit in der Mischung von gegorenen und nicht gegorenen Proben fast derjenigen in den nur gärenden gleich.¹⁾

Um sich weiter zu überzeugen, daß sich eine antiproteolytische Substanz in der Lösung befindet, wurde folgender Versuch angestellt.

Versuch IX.

Nach 2 tägiger Gärung von 30 g Preßhefe mit 35 g Saccharose in 200 ccm Wasser wurde die vergorene Flüssigkeit von der abgesetzten Hefe vorsichtig abgegossen und durch eine Chamberland-Kerze abfiltriert.

10 ccm dieser ganz klaren Flüssigkeit wurden zu einigen Proben der nicht gegorenen Preßhefe hinzugefügt. Jede Probe enthielt 10 ccm der Mischung, 15 g Hefe in 125 ccm Wasser und war vorher bei 53° mit Chloroform abgetötet worden. In anderen ganz gleichen Proben wurden anstatt der Gärungsflüssigkeit 10 ccm Wasser hinzugefügt, um die Konzentration des Enzyms nicht zu verändern. Außerdem wurden zur Kontrolle andere auf dem Wasserbade gekochte Proben mit Gärungsflüssigkeit und mit Wasser genommen und alle bei 48° stehen gelassen. Nach 3 Tagen zeigte sich bei der Analyse in den Proben folgender Eiweißgehalt:

	Nach 3 Tagen	
	Kontrolle	Selbstverdauung
Nicht gegorene Proben mit Wasser . . .	a) 25,9 b) 25,5	9,4
„ „ „ „ Gärflüssigkeit	a) 26,2 b) 26,5	15,8 16,4

¹⁾ Zunächst entstand die Vermutung, daß beim Abtöten der gegorenen Zellen die Fähigkeit zur Eiweißsynthese auf Kosten des bei der Gärung gebildeten Glykogens bewahrt wurde. Dann wäre die Hemmung des Zerfalls durch die Wirkung der entgegenwirkenden Prozesse erklärt. In der Mischung der gegorenen und nicht gegorenen Probe konnte die

oder die zerfallene Eiweißmenge in Prozenten der Anfangsmenge betrug 63% für die Probe mit Wasser und 37% für die Probe mit Gärungsflüssigkeit. Dies zeigt, daß die anti-proteolytische Substanz durch den Chamberlandfilter hindurchgehen kann, ohne in ihrer Wirkung etwas einzubüßen.

Der eben beschriebene Versuch läßt sich noch anschaulicher und einfacher durch die Methode von Mett ausführen.

Versuch X.

Die mit 4%iger Thymolgelatine gefüllten Kapillarröhrchen wurden in 2 Probierröhrchen mit bei 50° durch Chloroform abgetötetem Hefebrei eingelegt; dem einen wurde ein gleiches Volumen Gärungsflüssigkeit (von Versuch IX), dem anderen das gleiche Volumen Wasser hinzugefügt. Um die Verflüssigung der Gelatine durch die Temperatur zu vermeiden, mußten die Probierröhrchen bei Zimmertemperatur stehen bleiben und deswegen ging die Verdauung sehr langsam vor sich. Nach einem Monat fand ich, daß die verdaute Gelatinesäule in den beiden Kapillarröhrchen, welche sich in den Probierröhrchen mit Wasser befanden, 23 und 12 mm, in denjenigen, die in dem Röhrchen mit der Gärungsflüssigkeit waren, nur 6 und 7 mm betrug. Dann wurden, um die Natur der die Proteolyse hemmenden Substanz näher zu bestimmen, folgende Versuche angestellt:

Versuch XI.

Die Gärungsflüssigkeit des Versuchs IX wurde in 2 Teile geteilt. Ein Teil wurde 10 Minuten auf dem Drahtnetze gekocht, der andere nicht. Dann wurden wie früher die Proben der abgetöteten Preßhefe genommen, die je 25 ccm der Hefemischung (30 g Hefe in 160 ccm Wasser) enthielten. Zu den

Synthese durch die größere Menge der Eiweißzerfallprodukte besonders stark befördert werden. Der Versuch bestätigte das nicht. Weder der Zusatz der Eiweißzerspaltungsprodukte, noch der des Zuckers, zeigte sich ganz ohne Einfluß auf den Gang der Selbstverdauung der gegorenen Hefe.

einen wurden 10 ccm der gekochten Flüssigkeit, zu den zweiten 10 ccm der nicht gekochten und zu den dritten dasselbe Volumen Wasser hinzugefügt und 4 Tage bei 33° aufbewahrt. Die Analyse zeigte folgenden Eiweißgehalt der Proben:

	Vor dem Versuch	Nach dem Versuch
Wasser	44,9	10,6 } 9,8 9,0 }
Gekochte Flüssigkeit	44,9	12,6 } 12,1 11,5 }
Nicht „ „	44,9	22,3

Das Kochen schwächt also die Wirkung der hemmenden Substanz sehr stark ab, obwohl sie diese nicht ganz vernichtet. Das veranlaßte mich zu der Voraussetzung, daß die hemmende Wirkung durch einen flüchtigen Stoff erzeugt wird, der vielleicht durch das 10 Minuten lange Kochen nicht vollständig ausgetrieben worden war.

Versuch XII.

Die Gärungsflüssigkeit, die nach 2tägiger Gärung von 67 g Preßhefe in 1 l 20%iger Saccharoselösung von der abgesetzten Hefe abgegossen worden war, wurde durch eine Chamberland-Kerze abfiltriert und dann auf dem siedenden Wasserbade mit Rückflußkühler $\frac{1}{4}$ Stunde bei 95° gehalten.

In 2 Proben, die je 28 ccm der Hefemischung (30 g Preßhefe und 270 ccm Wasser) enthielten, wurden je 10 ccm dieser gekochten Flüssigkeit und zu den anderen 2 Proben je 10 ccm Wasser hinzugefügt und alle bei 33° mit Chloroform im Überschuß aufbewahrt. Nach 4 Tagen blieb folgende Eiweißmenge unverdaut zurück:

Mit Rückflußkühler gekochte Flüssigkeit	a) 21,8 } b) 20,0 }	20,9
Wasser	a) 11,8 } b) 9,4 }	10,6

Das zeigt, daß die antiproteolytische Fähigkeit gerade einer der flüchtigen Substanzen der Gärungsflüssigkeit eigen ist.¹⁾

Jetzt fragen wir nun, welcher von den flüchtigen Substanzen der Gärungsflüssigkeit man die antiproteolytische Fähigkeit zuschreiben kann. In erster Linie stand der Alkohol in diesem Verdacht. In der Tat zeigten schon Geret und Hahn,²⁾ daß 5%iger Alkohol auf die Selbstverdauung der Hefe hemmend einwirkt. Jedoch benutzten Geret und Hahn eine ziemlich grobe Methode der Eiweißbestimmung nach Gewicht des Koagulats. Um die untere Grenze der hemmenden Wirkung des Alkohols etwas präziser zu bestimmen, stellte ich folgenden Versuch an:

Versuch XIII.

Zu den Hefenproben, die je 25 ccm einer Mischung von 20 g Preßhefe mit 160 ccm Wasser enthielten, wurden je 1, 2 und 4 ccm absoluter Alkohol zugefügt, was in den Proben einer 4-, 8- und 16%igen Alkoholkonzentration entsprach. Die Proben wurden bei 48° mit Chloroform im Überschuß aufbewahrt und nach 2 Tagen analysiert. Der Eiweißgehalt betrug:

	Vor der Verdauung	Nach der Verdauung
Ohne Alkohol	51,5	10,4
Mit 4% >	51,5	16,6
> 8% >	51,5	34,9
> 16% >	51,5	45,6

Die hemmende Wirkung des Alkohols kann sich also erst bei der Konzentration von mehr als 4% bemerkbar machen. Da ich in meinen Versuchen zu 25 ccm

¹⁾ Diese Tatsache zeigt auch, daß der Verlust der Reaktionsfähigkeit bei dem üblichen Kochen nicht immer als ein Beweis der enzymatischen Natur der Reaktion dienen kann. Unter den flüchtigen Substanzen, die das übliche Kochen aus der Flüssigkeit entfernt, können sich nicht nur die reaktionshemmenden, sondern auch die reaktionsbeschleunigenden Substanzen befinden.

²⁾ Die Zymasegärung, S. 317.

Hefemischung 10 ccm der Gärungsflüssigkeit hinzufügte, mußte die Alkoholkonzentration derselben nicht weniger als $\frac{4 \times 25}{10} = 10\%$ sein, wenn wir die beobachtete hemmende Wirkung dem Alkohol zuschreiben wollten.

Doch zeigte die direkte Alkoholbestimmung in der Gärungsflüssigkeit mittels Gewichtsmethode, daß ihr Alkoholgehalt nie 7 Volumprozent überstieg. Daher muß die hemmende Wirkung den anderen flüchtigen Produkten der Alkoholgärung eigen sein.¹⁾

Unter diesen sind die flüchtigen Säuren, wie Ameisensäure, Essigsäure und teilweise Milchsäure, bekannt; sie finden sich aber doch nur in solcher Menge, die nach Geret und Hahn (l. c. S. 318) die Hefeselbstverdauung begünstigt.

Daher bleibt nichts anderes übrig, als den anderen flüchtigen Nebenprodukten, Aldehyden und Estern, die hemmende Rolle zuzuschreiben. Die Stoffe vereinigt man in der Gärungspraxis sehr oft unter der Bezeichnung Fruchtläther, weil das Aroma der Alkoholgetränke gerade durch diese Verbindungen hervorgerufen wird. In der Gärungsflüssigkeit erscheinen sie als Oxydationsprodukte des Alkohols und werden nur mittels der Lebenstätigkeit der Hefezelle gebildet.²⁾

Die Menge dieser Stoffe in der Gärungsflüssigkeit ist sehr gering, wodurch ihre hemmende Wirkung sich als eine negative katalytische Reaktion interpretieren läßt. Zur Kenntnis des Mechanismus dieser Reaktion hat vielleicht die von Schwarz konstatierte Tatsache eine Bedeutung. Er hat nämlich gefunden, daß die Eiweißstoffe mit Methyl- und Äthylaldehyden die Ver-

¹⁾ Bei der Untersuchung der Alkoholwirkung auf Pepsinverdauung fand Buchner, daß erst die Konzentrationen, die höher als 10% waren, die hemmende Wirkung ausüben. Bei höheren als 20%igen Konzentrationen hörte die Pepsinverdauung vollständig auf. Die von ihm benutzte Methode war aber doch zu grob, um diese Grenzen präzise zu bestimmen. Siehe Buchner, Arch. f. klin. Medizin, Bd. 29, 1881, S. 537.

²⁾ So konnte z. B. Roeser bei einer Hefekultur in 4%igem Alkohol die Aldehydbildung sehr leicht beweisen, aber bei derselben Lösung und unter denselben Bedingungen, jedoch ohne Hefe, keine Spuren von dieser Substanz finden. Siehe Duclaux, Traité de Microbiologie, T. III, p. 433.

bindungen bilden, welche sich gegen Trypsinwirkung sehr resistent verhalten. Daher ist es auch möglich, daß in unserem Falle die Hemmung durch Bildung der nicht reagierenden Zwischenprodukte verursacht wird.¹⁾

Jetzt können wir also sagen, daß die Eiweißstoffe durch die Alkoholgärung keine Zersetzung erfahren, weil die Nebenprodukte der Zuckerzersetzung eine solche hemmen.

Daraus kann man nicht schließen, daß sich die Eiweißzersetzung bei der Gärung in vollständiger Nährlösung, wo alle physiologischen Prozesse sich in vollem Gange befinden, nicht vollzieht. Die Hefezelle ist imstande, durch verschiedene Mittel diese hemmende Wirkung zu beseitigen. So gelingt es z. B. durch Zusatz der sauren Phosphate, die Selbstverdauung der Hefe sehr stark zu beschleunigen und die hemmende Wirkung der Gärungsnebenprodukte vollständig zu beseitigen, wie folgender Versuch zeigt:

Versuch XIV.

30 g Preßhefe wurden mit 400 ccm 15%iger Saccharose geschüttelt und die Mischung in zwei gleiche Teile geteilt. Zu einer Hälfte (200 ccm) wurden 2 g KH_2PO_4 zugesetzt und nach zweitägiger Gärung beide Hälften auf Proben zu je 25 ccm verteilt. Gleichzeitig wurden einige Proben zu je 25 ccm von der Mischung der nicht gegorenen Preßhefe genommen. Alle Proben wurden bei 3stündigem Stehen bei 52° mit Chloroform im Überschuß abgetötet und weitere 20 Stunden bei 47° gehalten. Der Eiweißgehalt der Proben betrug:

¹⁾ Wahrscheinlich wird durch diese Eigenschaft des «Fruchtäthers» die bis jetzt nicht erklärbare Tatsache aufgehellt, daß Bier und Wein sogar bei einem Alkoholgehalt von weniger als 3% die Magenverdauung sehr stark beeinflussen. Siehe Buchner, Arch. f. klin. Medizin, Bd. 29, S. 537.

Vielleicht gelingt es, die antiproteolytische Eigenschaft dieser Substanzen für die Trennung der Zymase von der Endotryptase auszunutzen, die bisher nicht möglich war.

	Vor der Verdauung	Nach der Verdauung	Prozente des zerfallenen Eiweißes der Anfangsmenge
Nicht gegorene . . .	26,3	12,1	54 %
Gegorene ohne KH_2PO_4	23,7	17,2	28 %
» mit »	24,9	8,7	65 %
» ohne » und nicht gegorene	50,0	34,4	31 %
Gegorene mit KH_2PO_4 und nicht gegorene	51,2	25,5	50 %

Die Tabelle zeigt, daß das Monokaliumphosphat die hemmende Wirkung der Gärungsprodukte nicht nur vollständig beseitigen kann, sondern selbst eine beschleunigende Wirkung auf die Proteolyse ausübt.

Durch solche einfachen und immer zugänglichen Mittel ist die Zelle imstande, die Eiweißzersetzung in vollkommenster Weise zu regulieren. Außerdem sind die hemmenden Produkte, wie schon gesagt, flüchtig und dadurch kann ihre Entfernung wahrscheinlich schon durch Lüftung der Hefe erreicht werden. Deswegen sind auch die Preßhefen von dieser Substanz frei und ihre Proteolyse geht besonders intensiv vor sich.

Wenn wir für die Hefegärung bewiesen, daß sich die Zuckerzersetzung ohne Eiweißzersetzung¹⁾ vollziehen kann, dann gilt dasselbe höchstwahrscheinlich auch für die alkoholische Gärung der anderen Pflanzen, die als intramolekulare Atmung bezeichnet wird. Der Mechanismus, wodurch die Eiweißzersetzung in den Versuchen von Palladin (s. oben) bei Anwesenheit von Kohlenhydrat aufhörte, ist vermutlich derselbe: bei intramolekulaner Atmung wie bei alkoholischer Gärung ergab die Zuckerzersetzung als Nebenprodukte die die Proteolyse hemmenden Stoffe. Dann kam die von Detmer (s. oben) konstatierte Eiweißspaltung bei Lupinus dadurch zustande, weil diese Pflanze bekanntlich besonders arm²⁾ an stickstofffreien Reservestoffen ist. Eine Hemmung kann man wahrscheinlich

¹⁾ Dadurch ist aber nicht ausgeschlossen, daß die Eiweißstoffe an diesem Prozesse irgendwie anders (z. B. als Fermente) Anteil nehmen können.

²⁾ Schulze, Landwirth. Jahrb., Bd. IX, S. 733.

bei künstlicher Einführung des Zuckers (beim Kultivieren in der Zuckerlösung) bewerkstelligen. Wenn Godlewsky¹⁾ unter diesen Bedingungen die Eiweißzersetzung beobachtete, bleibt es doch unentschieden, ob eine — vielleicht nicht vollständige — Hemmung dieser Zersetzung trotzdem zustande kam. Allerdings haben wir schon gesehen, daß die Wirkung der Zuckerzersetzung sich durch verschiedene Stoffe vollständig beseitigen läßt.

Ob derselbe Mechanismus bei sogenannter Deckung des Eiweißes durch Zucker bei Sauerstoffatmung funktioniert, läßt sich bis jetzt nicht sagen, obwohl diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, weil die Bildung der Aldehyde bei der Zuckerzersetzung sich auch bei Luftzutritt vollzieht. Daß die Eiweißzersetzung in diesem Falle so wenig wie bei der Gärung eine Rolle spielt, scheint mir aber sehr wahrscheinlich zu sein. Die meisten oben geführten Beweise gegen eine solche Zersetzung bei der Gärung sind auf die Sauerstoffatmung anwendbar, weil die beiden Prozesse (Gärung und Atmung) in allgemeinen Zügen übereinstimmen. Die Notwendigkeit, die Vermittelung der lebenden Eiweißmoleküle bei der physiologischen Verbrennung anzunehmen, die bis jetzt für alle Physiologen bestand, existiert zur Zeit nicht mehr.²⁾ Wir wissen jetzt, daß die von Sauerstoffabsorption und Kohlensäureausscheidung begleitete Zersetzung der Kohlenhydrate ebensogut nach dem Tode wie im Leben stattfindet.³⁾

Die jetzige Erklärung dieser Prozesse durch die Enzyme bedarf in vielen Fällen nicht der Hilfe des Eiweißes, da wir schon jetzt, bei unseren dürftigen Kenntnissen der chemischen Zusammensetzung der Enzyme, derartige kennen, deren eiweißartiger Charakter entschieden verneint wird.⁴⁾

¹⁾ Godlewsky, Extrait du Bulletin de l'Acad. des Sciences de Cracovie, mars 1904, p. 115.

²⁾ Vergl. Pfeffer, Pflanzenphysiologie, Bd. I, 1897, S. 552, und Nathansohn, Mittheil. aus d. Zoolog. Station zu Neapel, 15. Bd., 1902, S. 655.

³⁾ Sieber, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, 1903, S. 484.

Kostytschew, Ber. d. botan. Gesellsch., 1904, S. 207.

Maximow, Ber. d. botan. Gesellsch., S. 225.

⁴⁾ Oppenheimer, Die Fermente, 1900, S. 28.

Hafner, Diese Zeitschrift, 1904, Bd. XLII, S. 1.

Friedenthal und Miyamota, Zentralbl. f. Physiol., 1902, Bd. 15, S. 785.

Noch weniger haben wir einen Grund, dem Eiweiß beim Aufbau des atmenden Protoplasma den Vorrang vor anderen Verbindungen zu geben. Das Eiweiß geht nur in den Bestand des Plasma über, wenn es sich in den Proteiden mit anderen Gruppen von Stoffen vereinigt, mit Kohlenhydraten, Fetten, Lecithinen, Nucleinsäure usw.¹⁾ Hier bei tritt es oft in quantitativer Beziehung vor diesen anderen Verbindungen in den Hintergrund. So konnte schon Reinke (l. c.) keine Eiweißreaktion bei den *Vaucheria*-Zellen nachweisen und im Plasma von *Äthodium* betrug das Eiweiß nicht mehr als 6%. Die Spermatozoenköpfe beim Lachse und beim Hering enthielten rund 96% nucleinsaures Protamin, und sie sind eiweißfrei.²⁾ Lilienfeld³⁾ hat ferner bei einer quantitativen Analyse von Leukocyten im ganzen nur 1,76% (von Trockensubstanz) Eiweiß im gewöhnlichen Sinne gefunden.

Auf Grund alles eben Ausgeführten können wir sagen, daß die Eiweißzersetzung an der alkoholischen Gärung, sowie an der intramolekularen und höchst wahrscheinlich normalen Atmung keinen Anteil nimmt, und uns vollkommen dem *Bedauern Reinkes* anschließen, welches von ihm gelegentlich seiner Arbeiten über die chemische Zusammensetzung des Plasmas ausgesprochen wurde, nämlich daß das Dogma der Omnipotenz des Eiweißes «leider immer noch in der Pflanzenphysiologie sein Haupt hochhält».

Zum Schlusse erachte ich es als eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimrat Prof. W. Pfeffer für die große Freundlichkeit, womit er mir die Hilfsmittel des Leipziger botanischen Instituts zur Verfügung gestellt hat, und Herrn Dr. Simon, welcher mir beim Schreiben dieser Abhandlung in deutscher Sprache viel geholfen hat, meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Leipzig, Juli 1904.

¹⁾ Reinke, Untersuchungen an d. bot. Laborat. in Göttingen, 1881, Bd. 2, S. 54.

Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie, 1889, S. 102.

²⁾ Hammarsten, l. c., 379.

³⁾ Lilienfeld, Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 485.