

5 nimmt und zweckmässig auch während des Kochens noch kleine Portionen Superoxyd einträgt. Durch Ausäthern des Oxydationsgemisches erhält man die Säure in ziemlich reiner Form und guter Ausbeute. Durch Umkrystallisiren aus Aether und Ligroïn, in der oben angegebenen Weise, kann sie in wasserklaren, grossen Prismen erhalten werden. Letztere schmelzen bei $127^{\circ} 1$).

$C_4H_2Cl_2O_3$. Ber. Cl 41.97. Gef. Cl 41.93.

Die Krystalle sind denen der Mucobromsäure äusserlich ähnlich und auch isomorph. Bei der Messung fand ich:

System: monoklin.

Beobachtete Flächen: ∞P und OP . Der Prismenwinkel $\infty P : \infty P = 107^{\circ} 32'$. Die Neigung der Basis $OP : \infty P = 104^{\circ} 40'$.

$\angle \beta = 71^{\circ} 41'$. $a : b = 0.771 : 1$.

Die entsprechende, noch unbekannte Mucojodsäure suche ich jetzt zu erhalten. Auch gedenke ich die Reactionen auf Derivate des Furfurols anzuwenden.

Organ. Laboratorium der Techn. Hochschule zu Berlin.

322. Eduard Buchner und Rudolf Rapp: Alkoholische Gährung ohne Hefezellen.

[9. Mittheilung.]

(Eingegangen am 13. Juli.)

Im Folgenden finden einige Detailfragen, die mit der zellenfreien Gährung zusammenhängen, Beantwortung²⁾.

Wird bei fractionirtem Auspressen zerriebener Hefe anfangs oder später der wirksamere Saft ausgequetscht?

Nach den Versuchsergebnissen besitzen die zuerst erhaltenen Portionen viel geringere Gährkraft, wahrscheinlich da sie durch aussen an den Zellen haftendes Wasser verdünnt sind. 1200 g Münchner untergährige Bierhefe, bei 50 Atmosphären Druck entwässert, wurden mit dem gleichen Gewicht Quarzsand und $\frac{1}{5}$ des Gewichtes Kieselguhr in einer grossen Reibschale mit der Hand zerrieben und hierauf unter einem Druck von 60 kg auf 1 qcm 440 ccm Presssaft ausgepresst; die Gährkraftbestimmung erfolgte bei je einer Probe aus den ersten 50 ccm, dann aus den ccm 200—250, endlich aus den ccm 390—440. Hier-

¹⁾ Bisherige Angabe 125° .

²⁾ Bemerkt sei, dass I. Reynolds Green-Cambridge, welcher früher aus englischen Bierhefen keinen gährkräftigen Presssaft zu erhalten vermochte (s. diese Berichte 31, 1084), nunmehr auch zu positiven Ergebnissen gelangt ist (Annals of Botany 12 (1898), 491).

auf wurde der Presskuchen von Neuem unter einem Zusatz von 35 ccm Wasser zerdrückt und abermals 160 ccm ausgepresst (Gährkraft einer Probe s. No. 205). Es tauchte dann die Frage auf, ob nach Herstellung von 600 ccm Presssaft aus 1200 g Hefe der rückständige Presskuchen nur mehr wenig Zymase enthalte; zur Beantwortung wurde der Presskuchen von Neuem mit der Hand sorgfältig zerrieben und ohne Wasserzusatz hierauf nochmals ausgepresst; es resultirten noch 90 ccm Presssaft von besonders starker Gährwirkung (No. 206).

Tabelle XXXIII.

Je 20 ccm Saft + 8 g Saccharose + 0.2 ccm Toluol. 15—17°.

No.	Entnommen aus den Cubikcentimetern	lieferten Kohlendioxyd in g nach Stunden				
		18	42	66	90	138
202	1—50	0.09	0.20	0.26	—	—
203	200—250	0.24	0.56	0.82	—	—
204	390—440	0.25	0.63	0.95	—	—
205	441—600	0.27	0.63	0.98	—	—
206	601—690	0.51	1.12	1.56	1.81	1.98

Ist der Zymasevorrath der Hefezellen erschöpft nach Darstellung von 600 ccm Presssaft aus 1200 g Hefe?

Dieses Problem, durch Versuch 206 bereits angeschnitten, hielten wir einer ausführlichen Untersuchung werth. Der rückständige Presskuchen enthält darnach noch sehr erhebliche Mengen Zymase; unsere frühere gegentheilige Ansicht¹⁾ bedarf also der Berichtigung. Da die letzten Partien von ausgepresstem Saft sogar besonders starke Gährkraft bewiesen, entsteht die Vermuthung, dass möglicherweise nicht alle in den Hefezellen vorrätliche Zymase sich im wässrigen Zellsaft gelöst befindet, sondern vielleicht ein Theil erst in Folge der Wasserzusätze beim Auspressen in Lösung geht. Die ersten 600 ccm Saft wurden aus 1200 g Hefe unter Zusatz von 35 ccm Wasser genau wie für Tabelle XXXIII beschrieben, hergestellt; dann folgte ein abermaliges gründliches Zerreiben des rückständigen Presskuchens ohne Wasserzusatz und weiteres Auspressen, was die ccm 601—685 lieferte (Versuche No. 208 und 209); hierauf wurde der Presskuchen nochmals, und zwar unter Zusatz von 30 ccm Wasser zerdrückt und ausgepresst; es resultirten die ccm 686—730 (No. 210), sodass im Ganzen aus 1200 g Hefe unter allmählichem Zusatz von 65 ccm Wasser 730 ccm Presssaft erhalten worden waren.

¹⁾ Diese Berichte 31, 569.

Tabelle XXXIV.

Je 20 ccm Saft + 8 g Saccharose + 0.2 ccm Toluol. 15—17°.

No.	Entnommen aus den Cubikcentimetern	lieferten Kohlendioxyd in g nach Stunden				
		16	42	64	88	112
207	1—600	0.25	0.67	0.99	—	—
208	601—685	0.38	0.89	1.27	1.52	1.63
209		0.37	0.90	1.25	1.51	1.63
210	686—730	0.39	0.96	1.38	1.65	1.77

Sind beim Filtriren von Presssaft durch Biscuitporzellan die ersten oder die späteren Filtrate wirksamer?

Beim Auffangen von Partien zu je 20 ccm ist eine ausserordentlich rasche Abnahme der Gährkraft bereits von der ersten zur zweiten Portion nachzuweisen, welche wahrscheinlich auf einer baldigen Verstopfung der Filterporen beruhen dürfte. Möglich bleibt, dass die verwendete Kerze zufällig besonders engporig war. Von dem Phänomen von Sirotinin¹⁾ liess sich nichts bemerken. Der Presssaft war vor dem Filtriren durch die Biscuitporzellankerze bereits durch eine solche aus Kieselguhr gegangen. Zur Controlle wurde auch die Gährkraft desselben Presssaftes vor dem Filtriren festgestellt (No. 215).

Tabelle XXXV.

Je 20 ccm Saft + 8 g Saccharose + 0.2 ccm Toluol. 16—17°.

No.	Cubikcentimeter	lieferten Kohlendioxyd in g nach Stunden				
		16	40	64	88	
					Kohlensäure- verdrängung	
					ohne	mit
211	1—20	0.03	0.09	0.15	0.20	0.30
212	21—40	0.01	0.04	0.06	0.08	0.12
213	41—60	0.01	0.02	0.04	0.05	0.08
214	61—80	0.01	0.02	0.04	0.04	0.08
215	Controlle: Presssaft vor dem Filtriren	0.10	0.31	0.46	0.53	0.63

Welche Zuckerconcentration giebt die grösste Gährwirkung?

Für Rohrzucker sind bei Toluolzusatz und 23° Concentrationen von 15—30 pCt. nahezu gleich günstig²⁾; wie weit dieses Resultat

¹⁾ Diese Berichte 31, 209.

²⁾ Die von diesen etwas abweichenden Ergebnisse in Tabelle IV, diese Berichte 30, 2675, sind wahrscheinlich durch den Arsenitzusatz bedingt, der zu störenden Nebenwirkungen Anlass giebt

durch das gleichzeitige Spiel der verschiedenen Enzyme des Presssaftes, von Zymase, Invertase und proteolytischen Enzymen bedingt ist, für welche vielleicht verschiedene Optima gelten, lässt sich nicht beurtheilen. Für die Versuche kam im Vacuum eingedampfter und getrockneter Presssaft zur Verwendung, von welchem je 1 g in 7 ccm Wasser unter Zusatz von 0.07 ccm Toluol und der betreffenden Menge Rohrzucker in kleinen Erlenmeyer-Kölbchen von 50 ccm zur Lösung kamen; letztere wurden, um sie möglichst rasch auf die Versuchstemperatur zu bringen, in Wasser von der Temperatur des Thermostaten (23°) eingetaucht; die entweichende Kohlensäure musste durch etwa 1 ccm concentrirter Schwefelsäure und schliesslich durch ein Bunsen-Gummiventil streichen. Wir schlagen vor, als Gährkraft eines getrockneten Presssaftes die Gewichtsmenge Kohlendioxyd zu bezeichnen, welche 1 g desselben, gelöst in 7 ccm Wasser, bei Zusatz von 30 pCt. Rohrzucker (3.4 g) und 0.07 ccm Toluol unter Einhaltung obiger Versuchsanordnung und einer bestimmten Temperatur in 24 Stunden liefert; die Gährkraft für den getrockneten Presssaft der Versuche 221—226 ist demnach 0.30 (23°).

Tabelle XXXVI.

Je 1 g getrockneter Presssaft + 7 ccm Wasser + 0.07 ccm Toluol. 23°.

No.	Rohrzucker- zusatz in pCt.	lieferte Kohlendioxyd in g nach Stunden					nach 30 Stunden wurde auf 55° erhitzt und gleich- zeitig Luft durchgeleitet
		1½	4	7	24		
216	9	0.03	0.09	0.13	0.16		0.20
217	12.5	0.03	0.13	0.14	0.22		0.27
218	16.6	0.03	0.07	0.11	0.32		0.43
219	22.2	0.02	0.06	0.11	0.30		0.42
220	27.1	0.02	0.06	0.10	0.27		0.41

No.	Rohrzucker- zusatz in pCt.	lieferte Kohlendioxyd in g nach Stunden			nach 72 Stunden wurde auf 55—60° erhitzt und gleich- zeitig Luft durchgeleitet
		8	24	48	
221	10	0.14	0.16	0.17	0.20
222	15	0.16	0.33	0.34	0.37
223	20	0.14	0.35	0.40	0.42
224	25	0.13	0.33	0.43	0.46
225	30	0.11	0.30	0.43	—
226	40	0.07	0.22	0.38	—

Wieviel Kohlendioxyd entwickelt Münchner Hefepresssaft ohne Zuckerzusatz?

Bierhefe enthält in gewissen Lebensperioden beträchtliche Mengen von Glykogen aufgespeichert; eine sehr starke Beeinflussung unserer Gährversuche in Folge Vergärung von vorräthigem Glykogen durch die Zymase des Presssaftes war jedoch nicht zu befürchten, da die ausschliesslich verwendete Münchner Abfallbierhefe nach den Beobachtungen von H. Will¹⁾ nur geringe Mengen jenes Kohlenhydrates enthält. Drei von einander unabhängige Versuche haben als Maximum der Kohlendioxydentwicklung aus 20 ccm vorher nicht evacuirtem Presssaft ohne Zuckerzusatz nach 40 Stunden 0.06 g, nach 88 Stunden 0.1 g ergeben. Aehnliche Zahlen lieferten die früheren, hier auch vergleichbaren Versuche 141, 144, 152, 158.

Tabelle XXXVII.

1 pCt. Toluol, ohne Zuckerzusatz.

No.	Datum	Menge des Press- saftes	Temp.	lieferten Kohlendioxyd in g nach Stunden				
				16	40	64	88	
							Kohlendioxydverdrängung ohne	mit
227	31. V. 98	20 ccm	14°	0.03	0.04	0.04	0.04	0.08
228	"	"	"	0.05	0.06	0.06	0.06	—
229	2. VI. 98	"	"	0.03	0.04	0.04	0.04	0.08
230	26. V. 99	40 ccm	17°	0.07	0.10	0.10	0.10	0.18
231	"	"	"	0.06	0.09	0.10	0.11	—

Wird Stärke und Dextrin von Presssaft vergohren?

Eine geringe Gährwirkung gegenüber Stärke ist bereits früher constatirt²⁾; die neuen Versuche, bei erhöhter Temperatur angestellt, haben auch nicht mehr Kohlensäure geliefert. Es mangelt demnach der untergährigen Bierhefe ein diastatisch wirkendes Enzym in ausreichender Menge; auf die Anwesenheit von Spuren eines solchen wird wohl die beobachtete minimale Kohlendioxydentwicklung zurückzuführen sein, welche nur sehr wenig grösser ist, als die ohne jeden Kohlenhydratzusatz im Presssaft für gewöhnlich auftretende (s. Tabelle XXXVII). Sog. lösliche Stärke und Dextrine verschiedener Herkunft werden durch Presssaft zum Theil ziemlich lebhaft vergohren.

¹⁾ Zeitschr. ges. Brauwesen 21 (1898), 291.

²⁾ Diese Berichte 31, 1091.

Tabelle XXXVIII.

Bei No. 235–242 je 20 ccm Presssaft + 0.2 ccm Toluol; bei No. 232–234 je 1 g Stärke verkleistert mit 18 ccm Wasser und darin aufgelöst 2.8 g getrockneter Presssaft + 0.2 ccm Toluol.

No.		Menge des Kohlen- hydrats	Temp.	lieferten Kohlendioxyd in g nach Stunden				
				16	40	64	88	
							Kohlendioxyd- verdrängung	
							ohne	mit
232	Kartoffelstärke . .	1 g	22°	0.04	0.08	0.10	—	—
233	„	„	„	0.04	0.09	0.11	—	—
234	„	„	35°	0.09	0.10	—	—	—
235	Lösl. Stärke (Wroblewski ¹⁾)	3 g	15°	0.08	0.13	0.13	—	—
236	Lösl. Stärke (Syniewski ²⁾)	4 g	14°	0.13	0.23	0.28	0.29	—
237	Dextrin (purum)	„	„	0.28	0.47	0.57	0.65	0.69
238	„	„	„	0.29	0.47	0.57	0.65	—
239	„ (Witte)	„	„	0.32	0.55	0.72	0.86	0.98
240	„	„	„	0.34	0.57	0.75	0.89	—
241	„ (Kahl- baum)	8 g	16°	0.13	0.30	—	—	—
242	„ (Kahl- baum)	„	„	0.13	0.30	—	—	—

Vergäht lebende Bierhefe Glucose oder Fructose schneller?

Trauben- und Frucht-Zucker werden durch Hefepresssaft gleich schnell vergoren³⁾; hierin schien ein gewisser Gegensatz zum Verhalten von lebender Hefe zu bestehen, denn letztere sollte nach mehreren Autoren Glucose rascher als Fructose vergären⁴⁾. Zur Klarstellung haben wir frische Münchener untergährige Bierhefe unter denselben Bedingungen einerseits auf Trauben-, anderseits auf Frucht-Zucker einwirken lassen und nahezu gleiche Kohlendioxydzahlen erhalten⁵⁾. Die gegentheiligen Ergebnisse anderer Forscher mögen ihren Grund zum Theil darin haben, dass dabei Gemenge der beiden Kohlenhydrate gleichzeitig mit Hefe in Berührung gebracht wurden, wobei dann Glucose (vielleicht wegen ihrer labileren chemischen

¹⁾ Diese Berichte 30, 2108.

²⁾ Diese Berichte 30, 2415.

³⁾ Diese Berichte 31, 1091.

⁴⁾ Vgl. z. B. die Angaben von Duclaux, Ann. Pasteur 11 (1897), 349; ferner Prior, Ed. Kayser.

⁵⁾ Dieses Resultat wurde von Emil Fischer im mündlichen Gespräch vorausgesagt.

Natur) zuerst verschwand¹⁾, oder sie sind auf die besondere Natur der verwendeten Heferassen zurückzuführen.

Tabelle XXXIX.

Je 0.5 g lebende Hefe + 2 g Kohlenhydrat + 18 ccm von Meissl's Nährsalzlösung. 15—17°.

No.	Kohlenhydrat	lieferten Kohlendioxyd in g nach Stunden					
		5	16	24	40	48	64 mit Kohlensäure- verdrängung
243	Glucose . . .	0.07	—	0.44	—	0.74	—
244	Fructose . . .	0.06	—	0.41	—	0.69	—
245	Glucose . . .	—	0.43	0.67	0.80	—	0.89
246	Fructose . . .	—	0.41	0.61	0.78	—	0.89

Unregelmässige Wirkung von Arsenitzusatz.

Durch 2 pCt. Kaliummetarsenit wird die zellenfreie Gährung für gewöhnlich nicht gehemmt, sofort aber bei Verdünnung des Presssaftes mit einem Volum Wasser, bei Anwendung von Presssaft aus länger gelagerter Hefe und bei über 35° eingetrocknetem Presssaft²⁾. Wir glauben, diese verschiedenen Beobachtungen nun auf die gleiche Ursache zurückführen zu können.

Während durch Verdünnen des Presssaftes mit einem Volum Wasser die Gährkraft nicht wesentlich herabgesetzt wird (Versuche 247—250), sinkt dieselbe bei gleichzeitigem Zusatz von 2 pCt. Kaliummetarsenit fast auf Null (No. 251, 252); wird dagegen nur 1 pCt. Arsenit zugegeben, so ist wieder die Abnahme der Gährwirkung keine sehr starke (No. 253—255). Die Erhaltung der Gährkraft hängt demnach bei Arsenitzusatz von dem quantitativen Verhältniss zwischen Presssaftstoffen und Arsenit ab. Voraussichtlich mussten es die Eiweisskörper des Presssaftes sein, welche die Zymase durch eine Art von Schutzwirkung gegen den schädlichen Einfluss des Arsenits schützen; in der That haben zwei ausführliche Versuchsreihen (No. 256—262, 263—270) gezeigt, dass es einen grossen Unterschied bedingt, ob der Presssaft mit Wasser verdünnt wird oder mit Hefepresssaft, welcher durch kurzes Erhitzen gährunwirksam gemacht wurde, oder mit Blutserum; in beiden letzteren Fällen wirken 2 pCt. Arsenit viel weniger schädigend (Hühnereiweisslösung ist dagegen werthlos).

Man wird wohl annehmen müssen, dass die schädliche Wirkung des Arsenits auf die Zymase in einer Art von chemischer Bindung

¹⁾ Z. B. O. Reinke, Wochenschr. f. Brauerei 8 (1891), 813.

²⁾ Diese Berichte 31, 1089, 1532.

besteht¹⁾, dass aber bei Gegenwart von geeigneten Eiweisskörpern das Arsenit zuerst mit diesen in Reaction tritt und die Zymase verschont. Presssaft aus länger gelagerter Hefe scheint solche Eiweisskörper nicht mehr zu enthalten, vielleicht in Folge der Anwesenheit von proteolytischen Enzymen; ebenso dürften diese geeigneten Eiweisskörper beim Eindampfen des Presssaftes zur Trockne über 35° verändert werden; in beiden Fällen tritt daher die Giftwirkung des Arsenits schroff hervor.

Tabelle XL.
Verdünnungsversuche. 15–17°.

No.	Presssaft	verdünnt mit	Rohr- zucker	Anti- septicum	Kohlendioxyd in g nach Stunden			
					16	40	64	
							Kohlendioxyd- verdrängung	
	ccm	ccm	g	pCt.			ohne	mit
247	20	—	8	—	0.37	0.83	1.01	1.10
248	20	—	8	—	0.39	0.85	1.04	—
249	20	20 Wasser	16	—	0.27	0.60	0.64	0.71
250	20	20 Wasser	16	—	0.28	0.61	0.65	—
251	10	—	4	2 As	0.66	0.75	—	—
252	10	10 Wasser	8	2 As	0	0	0	0.01
253	10	—	4	2 As	0.45	0.48	0.50	0.52
254	10	10 Wasser	8	1 As	0.35	0.36	0.37	0.45
255	10	10 Wasser	8	1 As	0.32	0.35	0.36	—
256	20	—	8	1 Toluol	0.30	0.74	1.01	—
257	20	20 Wasser	16	1 »	0.22	0.59	0.72	—
258	20	20 f. P. ²⁾	16	1 »	0.31	0.67	0.77	—
259	20	20 Wasser	16	2 As	0.07	0.12	0.14	—
260	20	20 E. L. ³⁾	16	2 As	0.11	0.16	0.18	—
261	20	20 f. P. ²⁾	16	2 As	0.78	0.85	0.86	—
262	20	20 i. B. ⁴⁾	16	2 As	0.36	0.54	0.55	—
263	20	—	8	1 Toluol	0.24	0.64	0.91	—
264	20	20 Wasser	16	1 »	0.16	0.49	0.67	—
265	20	20 f. P. ²⁾	16	1 »	0.37	0.90	1.27	—
266	20	20 Wasser	16	2 As	0.03	0.06	0.08	—
267	20	20 f. P. ²⁾	16	2 As	1.22	1.41	1.41	—
268	20	20 a. P. ⁵⁾	16	2 As	0.93	1.00	1.00	—
269	20	20 i. B. ⁴⁾	16	2 As	0.64	0.96	0.98	—
270	20	20 a. B. ⁶⁾	16	2 As	0.72	0.93	0.94	—

¹⁾ Diese Berichte 32, 132.

²⁾ f. P. = frischer, 10 Minuten auf 50–55° erhitzter Hefepresssaft, bis die Gährwirkung auf Rohrzucker verschwunden ist.

³⁾ E. L. = Hühnereiweisslösung von 12 pCt.

⁴⁾ i. B. = inactives Blutserum (10 Minuten auf 60° erwärmt).

⁵⁾ a. P. = alter, durch Stehen unwirksam gewordener Hefepresssaft.

⁶⁾ a. B. = actives Blutserum.

Auch Zuckerzusatz übt eine ähnliche Schutzwirkung aus; es zeigte sich, dass 2 pCt. Kaliummetarsenit den Presssaft vollständig unwirksam machen, sobald man den Zuckerzusatz 2 Stdn. verzögert; bei gleichzeitigem Zusatz von Zucker und Arsenit tritt dagegen lebhafte Gährung ein. Auch hier ist wohl eine Art Bindung zwischen Zucker und Arsenit anzunehmen, wodurch letzteres gehindert wird, sich auf die Zymase zu stürzen.

Aus den Versuchen 274–277 ergibt sich ferner, dass Glucose durch Presssaft bei Arsenitzusatz vergährbar ist, während früher¹⁾ immer das Gegentheil beobachtet wurde; wir sind geneigt, diesen Unterschied auf eine etwas geänderte Qualität des Hefepresssaftes zurückzuführen, zu welchem die Hefe jetzt ausschliesslich mittels der Handzerreibungsvorrichtung zerrieben wird.

Diese Versuche verdienen vielleicht insofern Interesse, als sie zeigen, welch' mannigfache Gift- und Schutz-Wirkungen schon für einfache Enzyme bestehen; wie sehr viel complicirtere derartige Vorgänge mögen sich erst bei lebenden Organismen, im Thierkörper abspielen!

Tabelle XLI.

Zucker als Schutz gegen Arsenitwirkung.

20 ccm Saft + 8 g *D*-Glucose (nur bei No. 271 statt dessen 8 g Saccharose) + 2 pCt. Kaliummetarsenit; bei No. 274 wurde der Zucker in dem Saft gelöst und hernach das Arsenit zugegeben; bei allen übrigen wurde zuerst der Saft mit der Arsenitlösung vermengt, hierauf 0–4 Stunden in den Eisschrank gestellt und sodann erst der Zucker hinzugefügt. Zimmertemperatur.

No.	Vom Mischen von Saft und Arsenit bis zum Zufügen des Zuckers verflossene Zeit	Kohlendioxyd in g nach Stunden		
		16	40	64
271	4 Stunden	0	0	0
272	4 »	0	0	0
273	20 ccm Saft + 8 g Glucose + 1 pCt. Toluol zur Controlle	0.28	0.72	1.04
274	Glucose vor Arsenit zugesetzt	1.20	1.24	—
275	Glucose sogleich nach Arsenit zugesetzt	1.19	1.22	—
276	» 20 Minuten » » »	0.62	0.83	—
277	» 1 Stunde » » »	0.26	0.56	—
278	» 2 Stunden » » »	0	0	—

Berlin und München, den 12. Juli 1899.

¹⁾ Diese Berichte 31, 1039.