

Die Zymasegärung,

Untersuchungen über den Inhalt der Hefezellen
und die biologische Seite des Gärungsproblems.

Aus dem hygienischen Institut der Kgl. Universität München
und dem chem. Laboratorium der Kgl. landwirtsch. Hochschule zu Berlin

Eduard Buchner

(Berlin)

von

Hans Buchner

(München)

und

Martin Hahn

(München).



München und Berlin.

Druck und Verlag von R. Oldenbourg.

1903.

Vorwort.

Die Anregung zu diesem Buche ist von Hans Buchner ausgegangen, nach dessen frühem Tode wir die Drucklegung in dem verabredeten Sinne bewerkstelligten. Es berichtet zusammenfassend über die Resultate von Experimentalforschungen, welche im hygienischen Institute zu München 1896 begonnen und seitdem teils dort, teils im chemischen Laboratorium der landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin weitergeführt wurden. Die ersten Mitteilungen darüber erfolgten in Fachzeitschriften, welche nicht jedermann zugänglich sind, und entbehren naturgemäß der einheitlichen Gesichtspunkte, wie sie jetzt zur Geltung kommen können.

Das Ganze zerfällt in vier Teile. Wenn der Name von Hans Buchner nur in der Überschrift zum letzten derselben erscheint, so sind doch sein Ratschlag und seine Unterstützung auch für die übrigen von größter Bedeutung gewesen.

An der experimentellen Arbeit speziell über die Zymasegärung haben die damaligen Assistenten: Prof. Dr. R. Albert, E. Jüngermann, Dr. J. Meisenheimer und Dr. A. Spitta teilgenommen; ganz besonders aber hat sich Herr Dr. Rudolf Rapp darum verdient gemacht, welcher nicht nur den größten Teil der Versuche durchführte, sondern außerdem die Lesung der Korrekturen übernahm. Allen diesen Herren sei auch hier aufrichtiger Dank ausgesprochen.

Im Januar 1903.

Eduard Buchner.

Martin Hahn.

Inhaltsverzeichnis.

I. Teil: Über die Zymasegärung.

Von Eduard Buchner.

	Seite
I. Abschnitt. Geschichtliche Entwicklung unserer Kenntnisse über die alkoholische Gärung	1
Latour, Schwann, Kützing	3
Liebig's Zersetzungstheorie	5
Pasteur	7
Assimilationshypothese; Sauerstoffentziehungstheorie	9
Traube's Enzymtheorie	11
Vergebliche Isolierungsversuche	13
Entdeckung der Zymase	14
Zerreibung der Hefezellen	16
Der Hefepresssaft	21
Zellenfreie Gärung	22
II. Abschnitt. Das Agens im Hefesaft	25
Natur der Enzyme	25
Das Agens ist kein lebendes Protoplasma	30
Vergleich der Zymase mit den anderen Enzymen	35
Chemismus der Zuckerspaltung	38
Einteilung der Enzyme	45
Bedeutung der Zymaseentdeckung für Gärungschemie und Pflanzenbiologie	48
III. Abschnitt. Experimentelles über die zellenfreie Gärung	56
Herkunft der angewandten Sprosshefe	56
Herstellung des Hefepresssaftes	58
Andere Methoden zur Gewinnung von Hefesaft	66
Allgemeine Eigenschaften des Hefepresssaftes	71
Verhalten gegen Nitrite	73
Analysergebnisse verschiedener Hefepresssäfte	74
Gehalt des Presssaftes an Enzymen	76

	Seite
Gärkraft des Saftes	79
Zymasegehalt des rückständigen Prefskuchens	88
Gärkraft von fraktioniert ausgepresstem Saft	89
Die sogenannte Selbstgärung des Saftes	92
Verhalten der Gärkraft beim Aufbewahren des Saftes	97
Prefssaft und verschiedene Zuckerarten	98
Mikroorganismen im Hefeprefssaft	108
Hemmender Einfluss des Prefssaftes auf die Gärtätigkeit leben- der Hefe	112
Filtrieren des Hefeprefssaftes	115
Dialysieren des Prefssaftes	120
Hefeprefssaft und Verdauungsenzyme	126
Zentrifugieren des Hefeprefssaftes	128
Herstellung von getrocknetem Prefssaft	132
Lagern des Trockenpräparates	137
Erhitzen des Trockenpräparates	138
IV. Abschnitt. Spezielle Versuche über das Verhalten der Zymase	140
Einfluss der Reaktion der Flüssigkeit	140
Gärkraft bei verschiedenen Temperaturen	146
Einfluss der Zuckerkonzentration	150
Gärwirkung in schwacher und konzentrierter Zuckerlösung	156
Einfluss der Verdünnung des Saftes	158
Zymasewirkung bei sehr grosser Verdünnung	163
Einfluss von Salzzusätzen	165
Zusatz von antiseptischen Mitteln	169
Toluol und Thymol	176
Einwirkung von Arsenit	184
Unregelmässige Wirkung von Arsenit	193
Erklärungsversuch dafür	196
Eiweissstoffe als Schutz gegen Arsenit	199
Zucker als Schutz gegen Arsenit	203
V. Abschnitt. Die chemischen Vorgänge bei der zellen- freien Gärung	206
Kohlendioxydbildung	207
Alkoholbildung	209
Quantitative Alkohol- und Kohlensäurebestimmungen	210
Glycerin- und Bernsteinsäurebildung	216
Säurebildung bei der zellenfreien Gärung	223
Wärmeentwicklung	224
VI. Abschnitt. Versuche zur Isolierung der Zymase	226
Konzentrieren des Saftes durch Ausfrieren nach F. B. Ahrens	226
Hefeprefssaft und Fällungsmittel	228

Inhaltsverzeichnis.

VII

	Seite:
Fällung durch Alkohol	230
Längere Berührung mit Alkohol schädigt	235
Das Gewicht der Zymase ist verschwindend klein	236
Fällung durch Alkohol und Äther	237
Auflösung der Fällung unter Glycerinzusatz	240
Glycerinzusatz konserviert die Gärkraft	242
Zweimalige Fällung durch Alkohol und Äther	242
Fällung durch Aceton	243
Fraktioniertes Fällen durch Aceton	245
VII. Abschnitt. Zymase in getöteter Hefe	247
Dauerhefe durch Trocknen an der Luft	251
Dauerhefe durch Trocknen im Vakuum	252
Dauerhefe durch Alkohol-Äther-Behandlung	254
Wässrige Auszüge aus Alkohol-Äther-Dauerhefe	259
Chemische Vorgänge in der abgetöteten Hefezelle	264
Aceton-Dauerhefe	265
Demonstrationsversuch zur Gärwirkung	267
Haltbarkeit der Aceton-Dauerhefe	270
Sterilität der Aceton-Dauerhefe	271
Anwendung der Dauerhefe	274
VIII. Abschnitt. Zymasebildung in der Hefe	275
Lagern von Hefe unter Eiswasser	277
Lagern von abgepresster Hefe an der Luft	278
Regenerierungsversuche nach Hayduck	279

II. Teil: Über die Hefe-Endotryptase.

Von Martin Hahn und Ludwig Geret	287
Historisches	288
Eigenschaften des Hefeprefssaftes	292
Selbstverdauung	293
Verdauung anderer Eiweißkörper durch Hefeprefssaft	310
Begünstigende und hemmende Einflüsse	312
Charakterisierung des proteolytischen Enzymes der Hefe	320
Versuche zur Isolierung des Enzymes	323
Bedingungen der Enzyymbildung	327
Schlussfolgerungen	337

III. Teil: Zur Kenntnis der reduzierenden Eigenschaften der Hefe.

Von Martin Hahn.

Historisches	341
Reduktionswirkung des Prefssaftes auf Methylenblau	343
Die Ursache der Reduktionswirkung	345

IV. Tell: Beziehungen des Sauerstoffs zur Gärthätigkeit der lebenden Hefezellen.

Von Hans Buchner und Rudolf Rapp.

	Seite
Die biologische Seite des Gärungsproblems	350
Pasteur's Ansichten	351
Kritik der älteren Arbeiten	354
Untersuchungen von Chudiakow	359
Nachprüfung derselben	363
Neue Versuche	368
Übersicht der Resultate	378
Versuche mit Oberflächenkultur der Hefe	379
Gesamtresultate	389
Tabellenmaterial	391



I. TEIL.
ÜBER DIE ZYMASEGÄRUNG.

Von **E. Buchner.**

I. Abschnitt.

**Geschichtliche Entwicklung unserer Kenntnisse
über die alkoholische Gärung.¹⁾**

Läfst man Fruchtsäfte oder Zuckerlösungen an der Luft stehen, so zeigen sich nach einigen Tagen die Vorgänge, welche unter dem Namen Gärungserscheinungen zusammengefaßt werden. Es tritt eine Gasentwicklung auf, die klare Lösung trübt sich und es erscheint ein Niederschlag, den man als Hefe bezeichnet. Dabei verschwindet der süße Geschmack, während die Flüssigkeit eine berauschende Wirkung annimmt. Diese Beobachtungen sind uralte; man hat sich der Vorgänge auch jedenfalls seit den ältesten Zeiten des Menschengeschlechtes zur Herstellung gegorener Getränke bedient. Aber erst seit Lavoisier (Ende des 18. Jahrhunderts) ist bekannt, daß hierbei Zucker in Kohlensäure und Weingeist zerfällt. Die Rolle, welche die Hefe bei diesen Vorgängen spielt, blieb lange dunkel. Man glaubte, ihr Auftreten sei nebensächlicher Natur, und betrachtete sie als eine Art von minder-

¹⁾ Ausführliche Darstellungen der Geschichte der Gärungstheorien siehe bei: Adolf Mayer, Lehrbuch der Agrikulturchemie, 5. Aufl. III. Band, Gärungschemie, Heidelberg 1902; Franz Lafar, Technische Mykologie, I. Band, Jena 1897; Reynolds Green, the soluble ferments and fermentation, unter dem Titel: die Enzyme übersetzt von W. Windisch, Berlin 1901; Carl Oppenheimer, die Fermente, Leipzig 1900.

2 I. Geschichtl. Entwicklung unserer Kenntnisse über die alkohol. Gärung.

wertigem Ausscheidungsprodukt; der in den Sprachgebrauch übergegangene Ausdruck »die Hefe des Volkes« gleichbedeutend mit Auswurf des Volkes, weist noch auf jene Anschauung hin. In der Tat konnte auch, nachdem die analytischen Methoden ausgearbeitet waren, Gay-Lussac die Gewichtsverhältnisse zwischen vergorenem Zucker und gebildetem Kohlendioxyd und Alkohol ohne Berücksichtigung des Hefengewichtes durch die bekannte kurze Gärungsgleichung zum Ausdruck bringen, wonach ein Molekül Traubenzucker zerfällt in zwei Moleküle Kohlensäuregas und zwei Moleküle Alkohol, die heute noch Gültigkeit beanspruchen darf:



Angeregt durch die Appertsche Konservierungsmethode, nach welcher leicht zersetzliche Fruchtsäfte haltbar werden, wenn man sie in geeigneten Gefäßen aufkocht und letztere noch während des Kochens luftdicht verschließt, so daß beim Abkühlen dann im Innern der Gefäße ein luftverdünnter Raum entsteht, kam man auf die Vermutung, der Mangel an Luft in den Gefäßen bedinge die Haltbarkeit. Auch die konservierende Wirkung des Schwefeldioxyds beim Ausschweifen der Weinfässer ließ sich dahin deuten, daß hier die Gärung durch Absorption des nötigen Sauerstoffes, welcher sich mit schwelliger Säure allmählich zu Schwefelsäure verbindet, verhindert werde.

Diese Anschauungen sollten sich nicht als richtig erweisen. Bereits im Jahre 1680 hatte Leeuwenhoek die Hefe mikroskopisch untersucht und ihre ziemlich regelmäßige kuglige, ellipthische oder eiförmige Gestalt festgestellt; er war aber nicht imstande, aus diesem wertvollen Fund brauchbare Schlüsse zu ziehen, betrachtete die Hefe vielmehr als einen gewöhnlichen eiweißartigen Niederschlag und verglich sie mit den Stärkekörnern. Auch Erxleben's 1818 geäußerte Ansicht, daß die Hefe ein lebender Organismus sei und die Gärung verursache, führte, da er sie nur nebensächlich aussprach und ihre Tragweite wohl selbst unterschätzte, nicht zu wesentlichem Fortschritt. Fast zwei Dezennien verflossen noch, bis sich die neue Erkenntnis Bahn brach, auf Grund der unabhängigen Arbeiten von drei

Forschern, von Cagniard de Latour in Paris (1835), Theodor Schwann in Berlin (1837) und Friedrich Kützing in Nordhausen (1837). Kommt dem Franzosen, der sich hauptsächlich auf mikroskopische Beobachtungen beschränkte, die Priorität in der Erkenntnis der Tatsache zu, so hat Schwann, außerdem auch auf experimentellem Wege vorgehend, erst die strengen Beweise erbracht und Kützing seine Untersuchungen nicht nur auf die Hefe bzw. die alkoholische Gärung des Zuckers, sondern zugleich auf die Essigmutter, welche Alkohol in Essig überführt, ausgedehnt.

Schwann hatte die Art des Wachstums der Hefe beobachtet und konnte dadurch ihre Natur als lebende Pflanze außer Zweifel stellen. Er zeigte, daß auch dann das Appertsche Verfahren zum Ziele führt, wenn in den luftdicht geschlossenen Gefäßen ein großer Vorrat von Sauerstoff vorhanden ist. Die Haltbarkeit geht sogar nicht verloren, wenn nach Beendigung des Kochens ausgeglüht oder, wie Franz Schulze schon 1836 gefunden hatte, durch konzentrierte Schwefelsäure gewaschene Luft in die geschlossenen Gefäße geleitet wird. Sauerstoffmangel war also keineswegs die Ursache der Haltbarkeit. Als nicht statthaft erwies sich dagegen, nach dem Auskochen gewöhnliche Luft eindringen zu lassen; die Flüssigkeiten verdarben dann regelmäßig und zwar unter Entwicklung von Organismen. Es lag nun nahe, als Agens in nicht gechlühter, nicht gewaschener Luft Organismenkeime anzunehmen und die Lebensvorgänge der Organismen als Ursache der Gärung aufzufassen. Schwann war ferner der Ansicht, daß die Hefe den Zucker zu ihrer Ernährung verwende, während sie die unbrauchbaren Bestandteile in Form von Alkohol und Kohlensäure ausscheide.

Diese vitalistische Gärungstheorie fand scharfe Gegner. Im direkten Anschluß an das Referat über eine naive, nur auf den mikroskopischen Befund gestützte vitalistische Mitteilung von Turpin erschien im Jahre 1839 in den sehr angesehenen Annalen der Pharmazie eine anonyme Abhandlung¹⁾, betitelt »Das enträtselte Geheimnis der geistigen Gärung«. Wie aus dem veröffentlichten Briefwechsel zwischen Liebig und Wöhler hervor-

¹⁾ Liebig's Annalen der Pharmacie 29, S. 100 (1839).

geht¹⁾, war Wöhler der Verfasser der Streitschrift, aber Liebig selbst hatte noch einige schlechte Späße dazugemacht. »Ich bin im Begriffe«, so beginnt diese übermütige Satire, »eine neue Theorie der Weingärung zu entwickeln. Ich bin dieser bis jetzt so unbegreiflichen Zersetzung auf die einfachste Weise von der Welt auf die Spur gekommen und betrachte sie völlig als abgemacht. Auch diese Entdeckung beweist wieder, wie einfach die Mittel sind, deren sich die Natur bedient, um die wunderbarsten Erscheinungen hervorzubringen. Ich verdanke sie der Anwendung eines vortrefflichen Mikroskops, welches nach der Angabe des berühmten Ehrenberg von dem ausgezeichneten Künstler Pistorius ausgeführt worden ist. Mit Wasser zerteilte Bierhefe löst sich unter diesem Instrumente auf in unendlich kleine Kügelchen, welche kaum $\frac{1}{2000}$ Linie im Durchmesser haben, und in feine Fäden, die unverkennbar eine Art Eiweiß sind. Bringt man die Kügelchen in Zuckerwasser, so sieht man, daß sie aus Eiern von Tieren bestehen. Sie schwellen an, platzen und es entwickeln sich daraus kleine Tiere, die sich mit einer unbegreiflichen Schnelligkeit auf die beispielloseste Weise vermehren. Die Form dieser Tiere ist abweichend von jeder der bis jetzt beschriebenen 600 Arten, sie besitzen die Gestalt einer Beindorfschen Destillierblase (ohne den Kühlapparat). Die Röhre des Helmes ist eine Art Saugrüssel, der inwendig mit feinen $\frac{1}{2000}$ Linie langen Borsten besetzt ist, Zähne und Augen sind nicht zu bemerken; man kann übrigens einen Magen, Darmkanal, den Anus (als rosenrot gefärbten Punkt), die Organe der Urinsekretion deutlich unterscheiden. Von dem Augenblicke an, wo sie dem Ei entsprungen sind, sieht man, daß diese Tiere den Zucker aus der Auflösung verschlucken, sehr deutlich sieht man ihn in den Magen gelangen. Augenblicklich wird er verdaut und diese Verdauung ist sogleich und aufs bestimmteste an der erfolgenden Ausleerung von Exkrementen zu erkennen. Mit einem Worte, diese Infusorien fressen Zucker, entleeren aus dem

¹⁾ Aus Liebig's und Wöhler's Briefwechsel, herausgegeben von Hofmann und Emilie Wöhler, Braunschweig 1888, I. Bd. S. 123. Herr Jacob Volhard, gegenwärtig der älteste Liebig'schüler, hatte die große Freundlichkeit, mich darauf aufmerksam zu machen.

Darmkanal Weingeist und aus den Harnorganen Kohlensäure Um nur eine Idee der Vergleichung der Verdauungskraft dieser Tiere zu geben, lege ich die Angabe von Thenard zu Grunde, wonach drei Teile Bierhefe (in trockenem Zustand) eine Zersetzung von 200 Teilen Zucker in Weingeist und Kohlensäure zu bewirken vermögen; die Exkremente dieser Tiere, welche in 18 Stunden entleert werden, wiegen also 66mal so viel als die Tiere selbst Und in solch humorvoller Weise geht es weiter. Die Abhandlung beweist klar und deutlich wie sehr sich die Chemiker jener Zeit sträubten, einen Zusammenhang zwischen Gärungserscheinungen und lebenden Organismen anzuerkennen. Und niemand wird sich darüber wundern: es waren daran insbesondere die außerordentlichen Erfolge schuld, welche gerade damals die experimentelle Chemie errungen hatte, da es in mehreren Fällen gelungen war, scheinbar höchst komplizierte Prozesse auf die einfachen Wirkungen der chemischen Anziehungskräfte zurückzuführen und bis dahin nur auf physiologischem Wege erhaltene, in den Organismen gebildete Substanzen, wie den Harnstoff, synthetisch gleichsam im Reagenrohr darzustellen. Eben sei man erst dahin gelangt, einzusehen, daß alle Lebensvorgänge in den Pflanzen wie in den Tieren als physikalische und chemische Prozesse aufgefaßt werden müßten und nun kämen unwissenschaftliche Leute und wollten aus einfachen chemischen Prozessen Lebensakte machen. Liebig versuchte eine Erklärung rein chemischer Natur zu geben. Danach sollte die mit der Oxydation der Hefe verbundene chemische Bewegung sich auf den Zucker übertragen und dessen Zerfall verursachen (*Zersetzungstheorie*). Die Anwesenheit der Hefe schien somit nötig und die Infektionswirkung einer gärenden Flüssigkeit war erklärt. Aber nach Liebig spielte die Hefe nur die Rolle einer in steter Zersetzung begriffenen organischen Substanz. Absterbende, in Fäulnis übergegangene Hefe bietet allerdings Berechtigung zu dieser Auffassung, nicht aber frische, lebenskräftige, über deren Natur als lebende Pflanze sich Liebig einseitigerweise hinwegsetzte. Eine ähnliche Ansicht hatte Berzelius schon 1828 geäußert; danach sollte die Hefe lediglich durch ihre Gegenwart, als

»Kontaksubstanz« ohne sich selbst zu verändern, auf katalytischem Wege den Zerfall des Zuckers bewirken (*Kontakttheorie*); Analogien schienen da mit manchen anorganischen Prozessen vorzuliegen, z. B. mit der Einwirkung von feinst verteiltem Platin (Platinmohr) auf Wasserstoffsperoxyd, das bei Gegenwart jener Kontaksubstanz in Wasser und Sauerstoff zerfällt. Eine zum Teil allerdings viel später vorgenommene experimentelle Prüfung der Zersetzungs- und der Kontakttheorie brachte keine Anhaltspunkte für ihre Richtigkeit. Es gelingt nicht, Zuckerlösung durch einen hindurchgeleiteten elektrischen Strom (Helmholtz, 1842) oder durch Zusatz von in Zersetzung begriffenem Wasserstoffsperoxyd (Dumas, 1872) in Gärung zu bringen; ebensowenig zerfällt Saccharose in einer erwärmten Lösung von Ammoniumnitrit, das sich dabei in Stickstoff und Wasser spaltet (O. Loew).

Dagegen fielen eine Reihe von Versuchen der verschiedensten Forscher zu Gunsten der vitalistischen Theorie aus. Eilhard Mitscherlich¹⁾ zeigte, daß sich die Gärung durch eine Papierscheidewand nicht fortpflanzt, da diese die Hefekügelchen zurückhält und Gärung nur direkt an der Oberfläche der letzteren stattfindet. Hermann Helmholtz²⁾ bediente sich zu ähnlichen Versuchen einer tierischen Blase, und die Ergebnisse führten zu dem Satze: »Die weinige Gärung ist an den Zutritt eines festen Körpers gebunden, der durch die Blase zurückgehalten wird und unter welchem wir uns nur die Hefe denken können, deren vegetabilische Natur nicht mehr zu bezweifeln ist.«³⁾ Dieselben Experimente, mit faulenden Flüssigkeiten angestellt, mißlangen jedoch, so daß die Fäulnisprozesse proteinhaltiger Materie auf andere Ursache zurückgeführt wurden und unabhängig vom Leben zu bestehen schienen.

¹⁾ Liebig's Annalen der Chemie und Pharmacie 44, 201 (1842).

²⁾ Journal f. prakt. Chemie 31, 435 (1844).

³⁾ Ähnlich hat später Dumas (1872) bewiesen, daß auch ein Collodiumhäutchen zur Trennung einer gärenden und einer noch nicht in Gärung befindlichen Zuckerlösung genügt, sowie daß die Gärung in übereinandergeschichteten Flüssigkeiten von verschiedenem spezifischen Gewicht sich nicht von einer Schicht in die obere fortpflanzt.

H. Schröder konnte 1853 nachweisen, daß gewöhnliche Luft die Infektionswirkung für ausgekochte Flüssigkeiten schon beim Filtrieren durch Baumwollwatte verliert; die Bakteriologie verdankt ihm den heute allgemein üblichen Watterverschluss. Während der ersten gemeinschaftlich mit Th. von Dusch ausgeführten Untersuchung¹⁾ durch einige widersprechende Resultate besonders bezüglich der Fäulnisvorgänge und durch die merkwürdig analoge Wirkung eines Baumwollfilters bei übersättigten Lösungen noch zu mancherlei irrigen Ansichten verleitet, ist Schröder in der dritten Mitteilung²⁾ zu klarer Erkenntnis gelangt: *Keime in der Luft sind die Ursache der Gärung und Fäulnis und werden durch Baumwolle mechanisch zurückgehalten.* Auch van den Broek in Utrecht³⁾ entschied sich auf Grund vieler Versuche zu Gunsten der vitalistischen Anschauung bezüglich des Gärungsprozesses (bezüglich der Fäulnis war er irrtümlich zu entgegengesetzter Ansicht gekommen).

Aber gegenüber dem übermächtigen Einfluß von Liebig vermochten alle diese Forscher nicht durchzudringen. Es ist unzweifelhaft erst Pasteur's Verdienst, dem Satze: *keine Gärung ohne Organismen*, endgültig allgemeine Anerkennung verschafft zu haben. Durch, über ein Dezennium fortgesetzte, Versuche bewies er, dass ganz gegen Liebig's Theorie während der Gärung keine Fäulnis der Hefe eintritt; daß die Gärung mit dem Leben der Hefe, aber nicht mit dem Absterben und der Zersetzung derselben zusammenhängt; daß die Anwesenheit von zersetzlichen Eiweißkörpern in der Gärflüssigkeit unnötig ist, indem durch Aussaat einer winzigen Menge frischer Hefe eine künstliche Nährlösung zusammengesetzt nur aus Zucker, weinsaurem Ammoniak und einigen Mineralsalzen, in Gärung gerät. An Stelle der Baumwollstopfen, wie sie seit Schröder zum Schutz gegen Luftinfektion üblich waren, zeigte sich auch der Verschluss durch ein mehrfach zickzackförmig gebogenes enges Glasrohr, welches die Ablagerung schwebender kleinster

¹⁾ Liebig's Annalen der Chemie und Pharmacie 89, 232 (1853)

²⁾ Ebenda 117, 273 (1860).

³⁾ Liebig's Annalen der Chemie und Pharmacie 115, 75 (1860).

8 I. Geschichtl. Entwicklung unserer Kenntnisse über die alkohol. Gärung.

Partikelchen an den Wänden begünstigt, zulässig. Durch Erhitzen sterilisierte Watte, welche hernach zum Filtrieren von Luft gedient hatte, wurde ferner in keimfrei gemachte Zuckerlösung eingetragen und siehe, es entwickelten sich die bekannten Gärungserreger. Den schlagendsten Beweis aber, daß wirklich Mikroorganismen das rätselhafte Agens der Luft vorstellen, konnte Pasteur durch folgenden mustergültigen Versuch erbringen.

Die gewöhnliche Baumwollwatte wurde mit schwach nitrierter Schiefsbaumwolle vertauscht, die dasselbe mechanische Gefüge aufweist, aber im Gegensatz zu jener in Alkohol-Äther leicht löslich ist. Nachdem durch ein derartiges Filter Luft gesaugt worden war, wurde es aufgelöst und der Bodensatz mikroskopisch untersucht. Er bestand in der Tat aus denselben Organismen, wie sie in gärenden oder faulenden Flüssigkeiten anzutreffen sind. Jetzt waren die letzten Zweifler besiegt! *Das Agens in der Luft waren Organismenkeime. Niemand hatte Gärung ohne gleichzeitige Entwicklung von lebenden Organismen beobachtet; darüber war aller Streit zu Ende.* Die Gärung schien als physiologischer Akt untrennbar mit den Lebensprozessen der Hefe zusammenzuhängen.

Man bemühte sich nunmehr, das Phänomen biologisch zu verstehen; es tauchte die Frage auf, welchen Wert für die Hefezellen besitzen die Gärungsvorgänge? Von vornherein liegt am nächsten die Annahme, *daß die Zuckergärung mit der Nahrungsaufnahme der Hefezelle zusammenfalle*, der Zucker demnach als Nahrungsmittel assimiliert werde, während Kohlendioxyd und Alkohol als unbrauchbare Stoffwechselprodukte zur Ausscheidung gelangen. Diese Hypothese wurde tatsächlich von Schwann aufgestellt und später von Adolf Mayer¹⁾ befürwortet, von Liebig aber heftig bekämpft, während sich Pasteur weder dafür noch auch ausdrücklich dagegen äußert.²⁾ Es ist wohl das Verdienst Carl Nägeli's, hierin den richtigen Anschauungen zum Siege verholfen zu haben.³⁾ Die Gärungsvorgänge

¹⁾ Lehrbuch der Agrikulturchemie, 5. Aufl. Heidelberg 1902, III. Band. S. 66.

²⁾ Vgl. Maercker, Handbuch der Spiritusfabrikation 1890, S. 435.

³⁾ Theorie der Gärung, München 1879.

haben jedenfalls mit der Ernährung der Hefe direkt nichts zu tun. Dies erhellt bei Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse. Die Gay-Lussacsche Gärungsgleichung gibt ein ziemlich richtiges Bild des Zuckerzerfalles bei der Gärung, obgleich sie die Zunahme des Hefengewichtes gar nicht berücksichtigt. 100 Teile Traubenzucker werden von $1\frac{1}{2}$ Teilen Hefe (Trockengewicht) in 18 Stunden vergoren, wobei 95 Teile glatt in Alkohol und Kohlendioxyd gespalten werden, die zur Ernährung untauglich sind, 4 Teile in Glycerin und Bernsteinsäure übergehen und nur 1 Teil als Zunahme des Hefengewichtes wieder erscheint. Ist also die Gärung identisch mit dem Ernährungsvorgang der Hefe, so würde diese nur 1 Prozent ihrer Nahrungsaufnahme assimilieren und noch dazu von einem so leicht verdaulichen Stoff wie Zucker! Derartige Organismen wären zu bedauern! Nicht gärkräftige Mycelpilze, wie *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger*, vermögen, wie W. Pfeffer ermittelt hat, aus 100 Teilen Traubenzucker 33—43 g organisierte Substanz aufzubauen. Sind ferner Alkohol und Kohlendioxyd wirklich Ausscheidungsprodukte der Verdauung, so würde deren Menge etwa das Vierzig- bis Fünfzigfache des Gewichtes der Pflanzen selbst betragen. Hierzu kommt noch die viel bestätigte Tatsache des leichten Verlustes der Gärkraft, wonach Gärungserreger bei öfterem Umzüchten in gärungsunfähigen Lösungen die Gärwirkung einbüßen, ohne jedoch das Wachstumsvermögen zu verlieren. Sie leben wie die Mehrzahl der niederen Organismen — Gärungserreger sind ja doch verhältnismäßig nur wenige — in passenden Nährlösungen unter raschem Wachstum und üppiger Vermehrung; es wird aber selbst in Zuckerlösungen kein Alkohol gebildet und die erzielten chemischen Umsetzungen sind der Quantität nach nicht zu vergleichen mit den durch Gärungsvorgänge bewirkten. *Die Assimilationshypothese ist somit unhaltbar.*

Ein anderer interessanter Versuch, die Gärungsvorgänge biologisch verständlich zu machen, stammt von Pasteur. Es gibt eine eigentümliche Gruppe von Spaltpilzen, die sog. Anaerobien, welche nur in sauerstofffreien Räumen Gärwirkung auszuüben vermögen. Pasteur, welcher als erster derartige

Organismen beobachtete und das Aufhören der Gärungserscheinungen nach Zutritt von Luft wahrnahm, vermutete, daß die Gärungserreger wie alle anderen Pflanzen zum Leben Luft bedürfen, bei Mangel an freiem Sauerstoff denselben aber dem Gärmaterial, dem Zuckermolekül, entreißen, das so zum Zerfall kommt.

Die Gärungserreger seien ursprünglich aus rein aërobischen, gärungsuntüchtigen Mycelpilzen hervorgegangen und hätten die Gärwirkung als Anpassungsfunktion zum Ersatz des Atmungsprozesses erst erworben. Nach dieser *Sauerstoffentziehungshypothese* sind die Gärungserscheinungen also die *Folge des Lebens ohne freien Sauerstoff* und werden in Zusammenhang mit dem Atmungsprozesse gebracht, indem die Gärungsorganismen durch den Gärungsvorgang jenen Kraftvorrat gewinnen, der den übrigen Lebewesen durch den Atmungsprozefs zugeht. Allein die richtigen Beobachtungen, welche zu dieser Hypothese geführt haben, sind durchaus nicht allgemein gültig und bei den Anaëroben unterbricht Sauerstoffzufuhr nicht nur die Gärtätigkeit, sondern überhaupt alle Lebensfunktionen. Bei weitaus den meisten Mikroorganismen und gerade bei den wichtigsten Gärungserregern begünstigt im Gegenteil ausreichende Lüftung den raschen Verlauf einer Gärung; die Arbeiten von Schützenberger, Nägeli, A. Mayer und R. Pedersen über Hefegärung, von Eduard Buchner¹⁾ über Bakteriengärung haben dafür den Nachweis erbracht und vermehrtes Wachstum der Organismen infolge der Sauerstoffanwesenheit als die Ursache ergeben. An und für sich üben weder Sauerstoff- noch Wasserstoffzuleitung einen Einfluß auf den Gärungsvorgang aus, was aus den neuesten Versuchen von Hans Buchner und R. Rapp, welche den vierten Teil dieses Buches bilden, hervorgeht.

Aber die vitalistische Theorie war durch Pasteur's Eingreifen unbedingt Siegerin geblieben; niemand hatte Gärungsvorgänge ohne Anwesenheit von lebenden Organismen beobachtet. Auch Liebig mußte dies anerkennen und seine Vorstellungen über die Gärung 1870 entsprechend modifizieren. Denn eine lebende Zelle als solche kann sich nicht zersetzen; nur einzelne Stoffe könnten

¹⁾ Zeitschr. f. physiolog. Chemie 9, S. 380 (1885).

höchstens in Zersetzung begriffen sein und diesen Zerfall auf den Zucker fortpflanzen. Eine ähnliche Annahme hatte schon 1858 Moritz Traube ausgesprochen; *in den Hefezellen sollte sich neben allen anderen Stoffen auch ein chemischer Körper befinden, welcher die Gärung bewirkt (Enzymtheorie).*

Gewisse Analogien schienen dazu vorzuliegen. In keimender Gerste hatte Kirchhoff (Petersburg) und später Dubrunfaut die Anwesenheit einer Substanz vermutet, welche die Stärke in Zucker umzuwandeln vermag; Payen und Persoz gelang es 1833, diesen Stoff zu isolieren, indem sie ihn aus grünem Malz durch Wasser auszogen und dann durch Alkohol als weißes Pulver niederschlugen; sie nannten denselben *Diastase*. Auch in Hefe war schon die Existenz eines derartigen löslichen Körpers durch Döbberiner und durch Mitscherlich¹⁾ angenommen worden, welcher den Rohrzucker in Trauben- und Fruchtzucker zerlegen sollte; der Körper, von M. Berthelot 1860 aus wässriger Lösung durch Alkohol in festem Zustande tatsächlich abgeschieden, wird mit dem Namen Invertin oder zweckmäßiger *Invertase* (Sucrase) bezeichnet. Aus vielen Bakterien sind ähnliche Stoffe, die man nach Kühne's Vorschlag als *Enzyme* oder weniger gut als lösliche, unorganisierte Fermente zusammenfaßt²⁾, isoliert worden; sie führen teils Stärke, Gummi, Cellulose in gärfähigen Zucker über, teils verwandeln sie Albumine und Leim in Peptone. Sollten Enzyme die Gärung verursachen, so müßten, entsprechend den verschiedenen Gärungen, verschiedene existieren, ein Alkohol-, ein Milchsäure-, ein Buttersäuregärungsenzym. Von allen diesen war aber niemals auch nur ein einziges isoliert worden. Trotzdem blieb Traube unerschütterlich. Wenn niedere Organismen, so war seine Meinung,³⁾ die Ursache der Gärung sind, darf eine gesunde Naturforschung

¹⁾ Liebig's Annalen der Pharmacie und Chemie 44, 200 (1842).

²⁾ Adolf Mayer, Lehrbuch der Agrikulturchemie, 5. Aufl., III, Gärungschemie S. 13, rät, das doppelsinnige Wort »Ferment« ganz fallen zu lassen, was sehr zweckmäßig erscheint.

³⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 28, Ref. 1092 (1895); Gesammelte Abhandlungen, Berlin 1899, S. 74.

daraus nur schliessen, in diesen Lebewesen seien Stoffe, welche die Gärungserscheinungen bewirken. Die Stoffe müssen isoliert werden und wenn dies nicht gelingt, so liegt es daran, daß die zur Abscheidung angewandten Mittel jene Stoffe verändern. Wenn wir einen Diabetiker alles Amylum in Zucker verwandeln sehen, so würde man eine Hypothese für lächerlich halten, die den Diabetiker schlechthin als das Ferment für diese Umsetzung hinstellte und dadurch die ganze Frage für erledigt erachtete. Auch andere Chemiker teilten Traube's Ansicht, so Berthelot¹⁾, Claude Bernard, Schönbein und Schaer (1869) und insbesondere Felix Hoppe-Seyler, der eine prinzipielle Unterscheidung zwischen Gärwirkung, verursacht durch die lebenden Hefezellen, und Enzymwirkung, bedingt durch lösliche Eiweißstoffe, verwarf.

Die Pflanzenphysiologen verhielten sich jedoch ablehnend; Nägeli (1879)²⁾ sowohl wie Sachs (1882), traten mit einer Reihe von Einwänden hervor. Es wurde auf den großen Unterschied zwischen den bekannten Enzymwirkungen und der Zuckerspaltung in chemischer Hinsicht hingewiesen; die ersteren verlaufen glatt und ohne Nebenprodukte und sind durch einfachste chemische Mittel ausführbare Hydrolysen; bei der Gärung treten regelmäßig eine Anzahl von Nebenprodukten auf und der Prozeß ist ein chemisch komplizierter, kaum auf anderem Wege realisierbarer. Die gewöhnlichen Enzymwirkungen liefern Stoffe, die für die Ernährung der Organismen von größerer Bedeutung sind als die Ausgangsmaterialien, bei der Gärung verschwindet der wertvolle Zucker, während für die Ernährung untauglicher Alkohol und Kohlensäure resultieren.

Adolf Mayer³⁾ versuchte die Frage experimentell zu lösen. »Keineswegs war es indessen möglich, durch irgend eine der Versuchsanstellungen alkoholische Gärung und Hefepilzvegetation auseinander zu reißen.« Auch Pasteur selbst beschäftigte sich eingehend mit dem Suchen nach einem Enzym der alkoholischen

¹⁾ Chimie organique fondée sur la synthèse 1860, II, 655.

²⁾ Theorie der Gärung, München 1879, S. 12.

³⁾ Lehrbuch der Agrikulturchemie, 4. Aufl. II, 3 Gärungschemie 1895, S. 65.

Gärung, einer sogen. »*Alkoholase*.« P. E. Roux¹⁾ berichtet darüber in einer Festrede zu Lille, am 5. November 1898²⁾: »D'autres encore se mirent à la recherche de l'alcoolase. M. Denys Cochin fit au laboratoire de Pasteur des tentatives qui n'aboutirent pas. Pasteur lui-même entreprit des expériences sur le sujet, et je me souviens qu'à l'époque où j'entrai à son laboratoire il essayait d'extraire le ferment alcoolique soluble des cellules de levure en les broyant dans un mortier, en les congelant pour les faire éclater, ou encore en les mettant dans des solutions salines concentrées pour forcer le suc à sortir par osmose à travers l'enveloppe. Vains efforts. Pasteur ne trouva pas l'alcoolase, si bien que, s'il croyait son existence possible il ne pensait pas qu'elle fût une réalité.« Im Jahre 1878 haben C. Nägeli und O. Loew³⁾ versucht, Enzyme aus den Hefezellen zu isolieren; die letzteren wurden mit Wasser und mit Glycerin ausgezogen, die Auszüge mit Alkohol gefällt. »Es konnten indes außer der Eigenschaft, Rohrzucker zu invertieren, *keine anderen fermentativen Wirkungen* an dem erhaltenen Präparat wahrgenommen werden.«

Die Enzymtheorie war verlockend einfach und einleuchtend, aber jeder Versuch, ihre Richtigkeit experimentell zu beweisen, führte zu negativen Resultaten. Tatsächlich berechtigt schien nur die rein vitalistische Auffassung des Gärungsvorganges zu sein; und in dieser ist daher die heutige Generation der Naturforscher herangewachsen.

Nägeli⁴⁾ versuchte nach seinen Misserfolgen bezüglich des Extrahierens eines Gärungsenzyms aus den Hefezellen konsequenterweise eine physiologische Erklärung der ganzen Erscheinung zu geben, welche gerade das Scheitern aller Bemühungen um Isolierung eines solchen Stoffes verständlich machen sollte. »Gärung ist die Übertragung von Bewegungszuständen der Moleküle, Atomgruppen und Atome verschiedener, das lebende Plasma

¹⁾ Zweiter Direktor des Institut Pasteur in Paris.

²⁾ *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, Paris, 1, S. 512 (1898).

³⁾ Sitzungsberichte der bayer. Akademie der Wissenschaften, math.-phys. Klasse, 4. Mai 1878, S. 177.

⁴⁾ *Theorie der Gärung*, München 1879, S. 26.

zusammensetzender Verbindungen (welche hierbei chemisch unverändert bleiben) auf das Gärmaterial, wodurch das Gleichgewicht in dessen Molekülen gestört und dieselben zum Zerfall gebracht werden. Im Gegensatz zur älteren Liebig'schen Zersetzungshypothese wird also hier angenommen, daß die Verbindungen des lebenden Protoplasmas, ohne selbst zu zerfallen oder chemische Umsetzung zu erleiden, bloß durch ihre molekularen Bewegungen auf das Gärmaterial einwirken; im Gegensatz zur Enzymtheorie kann die Gärwirkung nach Nägeli niemals vom lebenden Protoplasma getrennt werden, da sie eben nur vom lebenden Plasma ausgeht. Wenn diese Erklärung auch zunächst wenig Befriedigung gewährt, so kann sie doch zweifellos das Verdienst beanspruchen, daß sie zu weiteren Versuchen Anregung gegeben hat. Im Verfolge dieser Anschauungen stellte sich nämlich die Frage ein: Kommen denn dem Plasma der Hefezellen überhaupt besondere Wirkungen zu? Welche chemischen Eigenschaften besitzt dasselbe?

Entdeckung der Zymase.

Die Hefezellen sind kleinen Bläschen zu vergleichen, erfüllt von einer halbflüssigen Masse, dem Protoplasma, das aus wechselnden Mengen gelöster und fester Eiweißstoffe besteht. Um das Protoplasma schließt sich lückenlos, wenigstens soweit der mikroskopische Befund darüber Aufschluß gibt, ein derbes Häutchen, die Zellmembran, welche ähnlich der Cellulose, außerordentlich widerstandsfähig ist. Nahrungsaufnahme und Abgabe von Ausscheidungsstoffen finden aber doch durch diese Membran hindurch auf osmotischem Wege statt. Wir müssen deshalb die Existenz von kleinen Poren annehmen, welche die Membran durchbrechen. Bei nicht ganz jugendlichen Hefezellen ist ferner häufig ein Teil des Protoplasmas wandständig, als besonderer Belag auf der Innenseite der Zellmembran, als sog. Plasmaschlauch, angeordnet; auch dieser reguliert das Eintreten von Substanzen in die Hefezellen und den Austritt von Inhaltsstoffen.

Bei chemischer Untersuchung des Zellinhaltes bereitet aber offenbar die Membran und der Plasmaschlauch Hindernisse; gibt es doch hochmolekulare Eiweißkörper, welche selbst durch

dichtes Pergamentpapier nicht diffundieren, gibt es doch sogar Enzyme, von welchen ein Gleiches berichtet wird, z. B. von gewissen Diastasen. Man hat nun versucht, Inhaltssubstanzen der Mikroorganismen durch wochenlanges Digerieren mit Wasser aus-zuziehen, wobei Invertase und allmählich auch Peptone in der Lösung erscheinen¹⁾; man hat ferner durch verdünntes Alkali in der Kälte oder Wärme Proteinsubstanzen extrahiert²⁾; man hat endlich die Organismen, z. B. Tuberkelbacillen, mit heißem, wäßrigem Glycerin behandelt³⁾. In allen diesen Fällen aber mußten die zur Extraktion gelangenden Stoffe erst durch die Zellmembran diffundieren und es ist mehr als wahrscheinlich, daß durch alle diese Verfahren nicht die ursprünglichen Inhaltsstoffe der Zellen, sondern nur durch die Einwirkung des Extraktionsmittels oder die lange Zeitdauer des Prozesses veränderte Abkömmlinge derselben erhalten wurden. Diese Übelstände zu vermeiden, war es zunächst nötig, die Zellmembran und den Plasmaschlauch aus dem Wege zu räumen, am besten durch Zerreißen; dann mußte durch rasches Verfahren verhindert werden, daß nicht schon während der Gewinnung eine Veränderung der Inhaltssubstanzen eintreten konnte; endlich durften nur rein mechanische Mittel, keine chemischen, zur Isolierung benutzt werden. Diese Gedanken bildeten sich im Gespräche mit meinem Bruder, dem Bakteriologen Hans Buchner in München, allmählich heraus.

Noch 1878 hatten Nägeli und Loew⁴⁾ erklärt, »die Schwierigkeiten der Hefenanalysen, wenn es sich nicht um die Elemente sondern um die Verbindungen handelt, besteht darin, daß die Zellen wegen ihrer Kleinheit auf keine Weise zer-

¹⁾ C. Nägeli und Loew, Sitzungsber. der Bayer. Akad. d. Wissensch., math.-physik. Klasse 1878, S. 162.

²⁾ Nencki, Beiträge zur Biologie der Spaltpilze, Leipzig 1880, S. 45; Berichte d. d. chem. Ges. 17, 2605 (1884). — Hans Buchner, Berliner klin. Wochenschrift 1890, Nr. 30, Nr. 47.

³⁾ Älteres Verfahren von R. Koch zur Herstellung von Tuberkulin, 1891, Deutsche medicin. Wochenschr. Nr. 3.

⁴⁾ Sitzungsber. der bayer. Akad. d. Wissensch., mathem.-physik. Klasse 1878, S. 161.

rieben, zerrissen oder zum Platzen gebracht und dadurch Inhalt und Membran auf mechanische Weise getrennt werden können«. Es scheinen rein theoretische Erwägungen gewesen zu sein, welche zu dieser Meinung veraulafsten. Den Mikroskopikern ist doch wohlbekannt, wie leicht gröfsere Hefezellen bei Herstellung eines mikroskopischen Präparates zerdrückt werden; es genügt dazu oft schon unvorsichtiges Auflegen des Deckglases. Meine ersten Versuche, die Zellmembran der Hefe durch Gefrieren bei — 16° und rasches Wiederauftauen zum Platzen zu bringen, verliefen ergebnislos; die Membran ist für eine derartige Zerreiſung viel zu dehnbar. Ebenso wenig gelingt direktes Zerreiben von Hefe in einer Reibschale, da das Pistill infolge des elastischen Materiales keinen Angriffspunkt findet. Dagegen zeigte sich (1893), dafs auch die kleinsten Mikroorganismen, z. B. die kürzesten kokkenartigen Wuchsformen des Friedländer'schen Pneumobacillus, nach Zusatz von feinem Sand zerreibbar sind, was unter dem Mikroskop direkt kontrolliert werden kann¹⁾.

Wie sich später herausstellte,²⁾ hat schon im Jahre 1846 Lüdersdorff in Berlin³⁾ nasse Hefezellen auf einer mattgeschliffenen Glasplatte mit Hilfe eines gläsernen Läufers zerrieben. »Die Operation ist der Kleinheit der Hefekügelchen wegen ziemlich zeitraubend, weshalb man den Versuch dann auch höchstens mit 1 g Hefe anstellen darf«. Zum Zerreiben war einstündige Arbeit nötig⁴⁾. Der Versuch wurde damals unternommen in der Absicht, zwischen Liebig's Zersetzungstheorie und der vitalistischen Anschauung über die Gärung zu entscheiden. »Betrachtet man die Hefe als einen organisierten Körper

¹⁾ Die Angabe von Robert Koch in seiner Mitteilung über ein neues Tuberkulin aus dem Jahre 1897, deutsche medicin. Wochenschr. 1897, Nr. 14: »Alles Zerreiben und Zerquetschen mit und ohne Zusätze von harten pulverförmigen Massen liefs die Tuberkelbacillen unverändert«, ist experimentell unrichtig. Bei Zusatz von Sand gelingt es ebensogut die feuchten, lebenden, wie die getrockneten Mikroorganismen zu zerreiben.

²⁾ Die erste Notiz darüber verdanke ich Herrn Adolf von Baeyer.

³⁾ Poggendorff's Annalen 67, 408 (1846).

⁴⁾ C. Schmidt in Dorpat, welcher die Versuche von Lüdersdorff 1847 wiederholte, hat zum Zermahlen von 1 g Hefe gar 6 Stunden Zeit gebraucht (Liebig's Annalen der Chemie 61, S. 171).

und betrachtet man infolgedessen, wie man nicht anders kann, die Wirkung derselben auf den Zucker als einen von Organen ausgehenden Eingriff in die Zusammensetzung des letzteren, so muß diese Wirkung aufhören, sobald die vorausgesetzten Organe unfähig gemacht werden, ihre Funktionen auszuüben, d. h. sobald sie zerstört werden. Dasselbe muß der Fall sein, wenn die Wirkung vom Kontakt und zwar so unklar ein solcher Begriff auch ist, von einem lebendigen Kontakt ausgehen soll.« Betrachtet man dagegen die Hefe nur als einen organischen, in Zersetzung begriffenen Körper, so kann eine Zertrümmerung die Wirkung auf den Zucker nicht beeinträchtigen. Die zerriebene Hefe wurde daher mit Traubenzucker versetzt; sie entwickelte »auch nicht ein einziges Gasbläschen«. Die vitalistische Theorie schien also bestätigt zu sein. Viele Jahre später hat Marie v. Manassein in Julius Wiesner's Laboratorium¹⁾ die Versuche von Lüdersdorff nachgeprüft, mit der Abänderung, daß nun lufttrockene Hefe »in einem Falle sechs, im andern fünfzehn Stunden von einem kräftigen Mann mit gepulvertem Bergkrystall in einem Glasmörser gerieben« wurde. Bei mikroskopischer Untersuchung zeigte sich, daß die meisten Zellen gänzlich zerstört waren; mit Zuckerlösung trat lebhafte Gärung ein, es fand aber auch eine reichliche Sprossung von Hefezellen statt. Da es somit nicht gelungen war, alle Hefezellen zu zerreiben, wurde die ganze Versuchsanordnung verlassen.

Behufs Isolierung von Invertase hat dann Adolf Mayer Hefe unter Zusatz von Sand zerrieben²⁾; des gleichen Verfahrens bedienten sich Amthor³⁾, dann Emil Fischer und P. Lindner⁴⁾, die mit Glaspulver, sowie M. Cremer⁵⁾, der unter Zusatz von Bergkrystallpulver zerrieb; sämtliche Autoren haben diese Versuche aber nicht in der Absicht ausgeführt, die Gärkraft zerrie-

¹⁾ Julius Wiesner, *Mikroskopische Untersuchungen*, Stuttgart, Maier, 1872, S. 126

²⁾ *Lehre von den chemischen Fermenten*, Heidelberg 1882, S. 14.

³⁾ *Zeitschr. f. angew. Chemie* 1892, S. 319

⁴⁾ *Ber. d. d. chem. Ges.* 27, S. 3479; 28, S. 3037.

⁵⁾ *Ztschr. f. Biologie* 1894, S. 188.

bener Hefe zu prüfen; die Enzymtheorie schien endgültig begraben. Nichts änderte daran, daß sich Frau v. Manassein 1872 auf Grund zahlreicher Experimentalstudien¹⁾ zu ihren Gunsten aussprach; lebende Hefezellen seien zur alkoholischen Gärung nicht notwendig. Die angewandten Methoden waren nämlich infolge der damals noch spärlichen Kenntnisse über die Bakterien so durchaus unsichere, daß man diese Versuche nicht als Beweise für die Enzymtheorie hinnehmen konnte, noch weniger heute²⁾.

Eine Wendung bereitete sich erst 1890 vor, als es P. Miquel in Paris gelang, nachzuweisen, daß die sog. Harnstoffgärung, die Umwandlung des Harnstoffs in Ammoniumcarbonat, welche in ausgeschiedenem Harn allmählich eintritt, nicht direkt durch die Lebenstätigkeit der anwesenden Bakterien sondern durch Vermittelung eines davon abtrennbaren Enzymes bewirkt werde, wie es Musculus schon 1874 hypothetisch vermutet hatte. Diese Substanz, *Urase* genannt, ist sehr zersetzlich, kann aber durch Alkohol ausgefällt werden und hydrolisiert den Harnstoff in steriler Lösung. Allerdings zeigt sich in chemischer Hinsicht ein großer Unterschied zwischen der alkoholischen Gärung des Zuckers und der Harnstoffgärung, welche nur in Anlagerung von einem Molekül Wasser besteht, einem Vorgang, der schon beim Erhitzen mit Wasser auf 120° von selbst eintritt.

Auch eine Bemerkung von Oskar Loew³⁾ aus dem Jahre 1886 kann man in dem Sinne deuten, daß er im Gegensatz zu Nägeli die Enzymtheorie noch immer für möglicherweise richtig hielt; er sagt: Was nun die Ausführung der Gärtätigkeit betrifft, so möchte ich meine eigene Ansicht dahin präzisieren, daß es am wahrscheinlichsten ist, daß in einer gärtüchtigen Pilzzelle zwei Arten von Protoplasma existieren; die eine Plasmaabteilung

¹⁾ Mikroskopische Untersuchungen, herausgegeben von Wiesner, Stuttgart, J. Maier 1872, S. 128 — Dieselben Anschauungen aufserte 1874 Schuhmacher, Sitzber. der Wien. Akad. 70, I. Abt.

²⁾ E. Buchner und R. Rapp, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 31, 212 (1898).

³⁾ Journ. f. prakt. Chem. 33, S. 351; vgl. Bacteriol. Centralbl. 7, S. 436 (1901).

besorgt die gewöhnlichen Vorgänge, wie Zellwandbildung, Wachstum, Teilung, während die andere lediglich die Gärwirkung ausübt; Loew setzte diesen »Zymoplasten« in Analogie mit dem Chlorophyllkorn der grünen Blattzellen.

1894 hat Emil Fischer aus verschiedenen niederen Pilzen neue Enzyme isoliert; in untergäriger Bierhefe wurde die *Maltase*¹⁾ aufgefunden, welche Malzzucker in zwei Moleküle Traubenzucker spaltet, in anderen Hefen die *Lactase*²⁾, welche Milchzucker zu Hexosen hydrolysiert, endlich gemeinsam mit P. Lindner in *Monilia candida ein Stoff*³⁾, der ähnlich wie *Invertase den Rohrzucker zerlegt*. Alle diese Substanzen sind aber aus den frischen Zellen erst dann zu extrahieren, wenn deren Membran durch Zerreiben mit Glaspulver zerrissen wird; im Gegensatz zur *Invertase* werden also diese Enzyme von den lebenden Hefezellen vollständig zurückgehalten, was ihren Nachweis bisher verhindert hatte. Noch eine weitere Entdeckung von Emil Fischer war einem Umschwung der Meinungen günstig. Vom Trauben-, vom Fruchtzucker und von vielen anderen Kohlenhydraten sind auf synthetischem Wege optische Antipoden erhalten worden, welche sich von den natürlichen Stoffen nur durch die räumliche Anordnung der Atome innerhalb des Moleküls unterscheiden. Den meisten chemischen Eingriffen, z. B. Phenylhydrazin gegenüber, verhalten sie sich völlig gleich, nicht aber der Gärwirkung gegenüber; nur die eine Reihe wird vergoren. E. Fischer zeigte, daß auch die Enzyme in der Regel von zwei optisch entgegengesetzten Hexobiosen (oder Disacchariden) nur die eine Form hydrolytisch zu spalten vermögen; er äußert darüber⁴⁾: »Noch wichtiger scheint mir der Nachweis zu sein, daß der früher vielfach angenommene Unterschied zwischen der chemischen Tätigkeit der lebenden Zellen und der Wirkung der chemischen Agentien in Bezug auf molekulare Asymmetrie tatsächlich nicht besteht. Dadurch wird insbesondere die von Berzelius, Liebig und anderen so

¹⁾ Ber. d. d. chemischen Gesellschaft 27 S. 3480 (1894).

²⁾ Ebenda 27, S. 3481.

³⁾ Ber. d. d. chem. Ges. 28 (1895), S. 3037.

⁴⁾ Ber. d. d. chem. Ges. 27 (1894), 2993.

häufig betonte Analogie der lebenden und leblosen Fermente in einem nicht unwesentlichen Punkte wieder hergestellt.«

Im Jahre 1896 hat H. Will in München¹⁾ beobachtet, daß neun Jahre bei niedriger Temperatur trocken gelagerte Hefe, obwohl fast alle Zellen abgestorben waren, nach Zusatz von Zuckerlösung noch lebhaft Gärwirkung ausübte; auf Grund dieser Versuche wird die Enzymtheorie ausführlich diskutiert, eine bestimmte Ansicht vorläufig aber allerdings nicht ausgesprochen. Franz Lafar gibt kurz vor Entdeckung der Zymase folgende Prognose für die Enzymtheorie²⁾: Vorläufig haben wir die Enzyme »nur als Gegenstand einer Gärungstheorie zu betrachten, deren Aufstellung schon in das Jahr 1858 zurückreicht, welche aber gerade in den letzten Jahren wieder mehr in den Vordergrund getreten ist und in der Zukunft — so wie die bisher ermittelten Tatsachen jetzt schon ermessen lassen — an Wichtigkeit noch gewinnen wird«.

Die Annahme würde aber nicht der historischen Wahrheit entsprechen, daß meine eigenen Versuche, begonnen 1893 in München³⁾, durch jene Arbeiten und Äußerungen direkt angeregt wurden, denn die letzteren sind meist jüngeren Datums. Sie zeigen aber, daß derartige Auffassungen damals in der Luft lagen und die Zeit reif war für einen neuen Fortschritt auf dem Gebiete der Gärungschemie.

Mischt man frische, aber trocken abgepresste Hefe mit Quarzsand und Kieselgur und bearbeitet das staubtrockene Pulver kräftig in der Reibschale, so nimmt es bald (innerhalb zwei bis drei Minuten) eine feuchte, teigige Beschaffenheit an; gleichzeitig

¹⁾ Zeitschr. f. d. gesammte Brauwesen 19 (1896), 20.

²⁾ Technische Mykologie, Jena 1897, S. 21.

³⁾ Die Methode der Zerreibung von Mikroorganismen nach Zusatz von Sand ist 1893 zum Patent angemeldet worden, wurde in Berlin ausgelegt, die Patentfähigkeit aber schließlicly verneint. Doch sind hierdurch weitere Kreise auf die Möglichkeit aufmerksam gemacht worden, die für manche Zwecke schädliche Zellmembran durch Zertrümmern der Zellen auszuschalten. Bemerkt sei, daß Robert Koch's neueres Verfahren zur Herstellung von Tuberkulin, wonach die Tuberkelbacillen zu feinem Staub zerrieben und sodann mit Wasser extrahiert werden, erst am 1. April 1897 (deutsche medicin. Wochenschr. 1897, Nr. 14) veröffentlicht wurde (vgl. H. Buchner, Berl. klin. Wochenschr. 1897, Nr. 15).

geht die ursprünglich gelbweisse Farbe in einen tief graubraunen Farbenton über. Flüssigkeit ist aus dem Innern der Hefezellen herausgetreten. Man setzt die plastische Masse nun einem hohen Druck von 60 bis 90 kg auf ein 1 qcm aus. Dem Teige entquillt eine fast klare, gelb bis braungelbe Flüssigkeit, welche mehr als die Hälfte des gesamten Inhalts der Hefezellen repräsentiert. Ausgerüstet mit einer grossen Reibschale, einem wuchtigen Pistill und einer hydraulischen Presse kann man innerhalb vier Stunden 500 ccm Prefssaft gewinnen. Bei diesem mechanischen Verfahren ist in der kurzen Zeit eine chemische Veränderung des Zellinhaltes nicht zu befürchten.

Der Prefssaft besitzt nun tatsächlich die Eigenschaft, Kohlenhydrate in Gärung zu versetzen. Beim Mischen mit einem Raumteil einer starken Rohrzuckerlösung beginnt schon nach etwa einer Viertelstunde regelmässige Kohlensäureentwicklung in der klaren Flüssigkeit, die bei niederer Temperatur Wochen lang anhält. Neben Kohlendioxyd entsteht Äthylalkohol, und zwar beide Produkte in annähernd gleicher Menge, wie es auch für die Gärung durch lebende Hefezellen charakteristisch ist. Rohrzucker-, Trauben-, Frucht- und Malzzucker können so in Gärung versetzt werden, nicht aber Milchzucker und Mannit, obwohl doch diese Substanzen, chemisch betrachtet, den ersteren recht nahe stehen. Bekanntlich ist auch die lebende untergärrige Bierhefe nicht imstande, Milchzucker oder Mannit zu vergären. Wenn es noch des Beweises bedurft hätte, dafs die Gärung des Prefssaftes auf dieselbe Weise zustande kommt, wie die der lebenden Zellen, so wird er dadurch erbracht.

Auch ist leicht festzustellen, dafs nicht etwa im Prefssaft vorhandene einzelne Hefezellen oder Spaltpilze die Gärwirkung desselben bedingen. Dazu setzt die Gärung schon viel zu rasch und gewaltig ein; dann bleibt der Zusatz von antiseptischen Mitteln wie Chloroform, Toluol, hohen Zucker- und Glycerinmengen ohne Einfluss, obwohl dadurch die Lebensfunktionen von Organismen völlig hintangehalten werden. Endlich kann man den Prefssaft durch Porzellanbiskuitkerzen keimfrei filtrieren ohne seine Wirksamkeit vollständig zu vernichten.

Welche Folgerungen sind aus diesen Tatsachen für die Theorie der Gärung zu ziehen? Zunächst die eine, daß es zur Einleitung des Gärungsvorganges keines so komplizierten Apparates bedarf, wie ihn die Hefezelle vorstellt: *es gibt eine »zellenfreie Gärung«.*

Gewebelemente und einzelne Organe der Pflanzen und Tiere können nach Lostrennung vom Gesamtorganismus unter günstigen Umständen noch längere Zeit lebend erhalten werden. Es stellte sich demnach die weitere Frage ein: sind als wirksames Agens im Prefsaft vielleicht lebende Protoplasmastückchen und -splitter zu betrachten? Eine Reihe von Versuchen gibt darüber Auskunft, von denen hier nur einige angeführt seien.

Zunächst besitzt die durch Alkohol und Äther im Prefsaft erzeugte, amorphe Fällung nach dem Wiederauflösen in 5proz. Glycerin Gärkraft, ja die nämliche wie der ursprüngliche Saft. Lebende Plasmasplitter müßten durch Alkohol und besonders durch Äther schwer geschädigt werden. Die Isolierung des Agens gelingt also auf demselben Wege wie man die bekannten Enzyme z. B. Invertase, Diastase etc. ausfällt. Ferner kann man den Prefsaft im Vakuum eintrocknen und hernach wieder zur Lösung bringen ohne an Gärkraft einzubüßen. Der getrocknete Prefsaft kann viele Monate aufbewahrt werden ohne im Geringsten an Wirksamkeit zu verlieren. Lebende Plasmasplitter würden bei vollständigem Trocknen und langem Lagern doch höchst wahrscheinlich geschädigt werden. Endlich ist das gärkräftige Agens auch in vorsichtig getöteten Hefezellen noch vorhanden, kann aus diesen durch Wasser oder verdünntes Glycerin ausgezogen und in Lösung gebracht werden. Dabei bleibt es gleichgültig, ob die Hefe durch Trocknen und Erhitzen oder nach R. Albert¹⁾ durch Behandlung mit Alkohol und Äther oder mit Aceton²⁾ getötet wurde; die Hauptfunktion des Protoplasma, die Assimilation, ist erloschen; dasselbe muß deshalb als tot bezeichnet werden; »lebend« d. h. richtiger »chemisch unverändert« könnten höchstens gewisse Teile desselben geblieben sein.

¹⁾ Ber. d. d. chem. Ges 33, S. 3775 (1901).

²⁾ R. Albert, E. Buchner und R. Rapp, ebenda 35, S. 2376 (1902).

Diese Tatsachen, zu welchen noch andere hinzutreten, deren Aufzählung hier zu weit führen würde, machen also die Gegenwart von gärungserregenden, noch lebendigen Protoplasmasplittern unwahrscheinlich, lassen dagegen die Annahme eines den Enzymen nahestehenden Agens wohl begründet erscheinen, das in colloidal gelöster Form, ähnlich in Wasser gelösten komplizierten Eiweißkörpern, im Prefsaft vorhanden ist. Diese Substanz, vermutlich ein besonderes Umwandlungsprodukt der Eiweißkörper des Protoplasma, die den Namen *Zymase* erhalten soll, befindet sich im Prefsaft noch genau in demselben Zustand wie in den lebenden Hefezellen; sie stellt aber einen bestimmten chemischen Stoff vor, keinen lebenden Organismus; sie entbehrt des Stoffwechsels, des Wachstums und der organisierten Struktur. Physiologische Vorgänge kommen bei der alkoholischen Gärung nur mehr insofern in Frage, als es die lebenden Hefezellen sind, welche die Zymase bereiten. Der Gärungsakt selbst, die Einwirkung der Zymase auf den Zucker muß als rein chemischer Vorgang bezeichnet werden. Die Wandlung in den Anschauungen fällt um so deutlicher in die Augen als gerade die Hefegärung seit Pasteur als Hauptbeweis für die vitalistische Theorie des Lebens galt.

Bezüglich des Mechanismus des Gärungsvorganges ist allerdings der in der Zymaseentdeckung 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 u. s. w. fehlt uns fast jede Vorstellung.

Diejenigen Probleme aber, welche die Zeitgenossen Liebig's und Pasteur's bewegten, sind gelöst; es ist Platz geschaffen zur Inangriffnahme neuer Rätsel und an solchen ist kein Mangel. Fragen wir, wer nun schliesslich Recht behalten hat, Liebig oder Pasteur, so wird die Antwort lauten müssen: beide; Pasteur insofern als zur Zymasebildung nur Organismen befähigt sind, Liebig, da in letzter Linie bei der alkoholischen Gärung nicht die lebenden Hefezellen, sondern ein abtrennbares Enzym zur Wirkung kommt. Wollen wir aber etwa die Ver-

24 I. Geschichtl. Entwicklung unserer Kenntnisse über die alkohol. Gärung.

dienste der jetzigen Generation bezüglich Aufklärung des Gärungsphänomens vergleichen mit denen unserer Vorfahren, so wird man, um gerecht zu sein, sich der Worte des Dichters erinnern müssen, daß der Zwerg auf den Schultern des Riesen weiter sieht als der Riese selbst. Wenn die Erklärung der Naturerscheinungen nach der bekannten Definition in einer möglichst umfassenden Beschreibung besteht, so darf man die Entdeckung der Zymase als einen wesentlichen Schritt zur Erklärung der Gärungsvorgänge betrachten. Wir befinden uns allerdings in der Lage eines Entdeckungsreisenden, der eine steile Anhöhe, das lang erstrebte Ziel seiner Vorgänger, eben erklommen hat. Nun fällt der Blick auf neues unbekanntes Land; aber schon wieder erscheinen Höhenzüge, die der freien Aussicht eine Grenze setzen.

II. Abschnitt.

Das Agens im Hefesaft.

Durch die Darstellung von gärkräftigem Prefsaft unter Zerkümmerung der Hefezellen war bewiesen, daß der komplizierte Mechanismus der Zellen für die Gärwirkung unnötig ist. Es lagen nun zwei Möglichkeiten vor, das Agens im Hefesaft konnten entweder lebende Plasmastückchen oder ein Enzym sein. Die Entscheidung ist zu Gunsten der letzteren Annahme ausgefallen. Bevor die Gründe dafür ausführlich dargelegt werden sollen, scheint es nötig, zunächst auf die Beschaffenheit der Enzyme überhaupt einzugehen.

Natur der Enzyme.

Enzyme sind bisher nur aus Pflanzen oder Tieren erhalten worden; eine künstliche Darstellung ist niemals gelungen; man hat sie deshalb vielfach mit dem lebenden Protoplasma identifiziert und ihre Wirkung diesem selbst zugeschrieben. Eine solche Auffassung ist zu verwerfen; sie verwechselt Teile mit dem Ganzen.

Der Begriff »lebendes Plasma« ist ein wenig bestimmter; man versteht damit der Hauptsache nach ein Gemenge verschiedener Eiweißkörper, welche als Träger der Lebensfunktionen gelten, dann von Kohlenhydraten, Fettstoffen und Wasser. Darunter können sich auch Enzyme befinden. Es ist nicht sicher, ob alle Vertreter dieser Körperklasse den Eiweißstoffen zuzurechnen sind, denn manche scheinen einen sehr niederen Stickstoffgehalt

zu besitzen oder sogar frei von jenem Elemente zu sein. Sie werden aber jedenfalls aus den Eiweißkörpern des Protoplasma entstehen. Schon 1882 hat Adolf Mayer die Enzyme als Organismenreste¹⁾ oder als Protoplasmasplitter bezeichnet. Sobald es gelingt, aus dem lebenden Plasma eine Substanz abzusondern, welche nach Verlust jeder Organisation, durch Alkoholfällung in trockenen Zustand übergeführt und wieder gelöst, bei Gegenwart von antiseptischen Mitteln imstande bleibt, eine Teilfunktion des ursprünglichen Organismus zu vollziehen, ist es bewiesen, daß anderes als das Gesamtprotoplasma vorliegt. Da man ein Zahnrad nicht als ein Uhrwerk, einen Wasserkessel nicht als eine Dampfmaschine bezeichnen wird, kann es auch nicht statthaft sein, die Enzyme mit dem Gesamtprotoplasma zusammenzuwerfen.

Die Enzyme erscheinen somit als abgesonderte Teile des lebendigen Protoplasmas oder als erste Umwandlungsprodukte von solchen. Sie stehen auf der Grenze zwischen lebloser und lebender Materie. Obwohl sie nach der Isolierung noch genau in demselben chemischen Zustand verharren, wie in der lebenden Zelle, sind sie aber nicht als »lebend« zu bezeichnen. *Als Kennzeichen des Lebens wird man Assimilation und Vermehrung und wahrscheinlich auch die organisierte Struktur aufzufassen haben. Diese charakteristischen Merkmale fehlen den Enzymen, und man müßte das Leben anders definieren wie bisher, wollte man solche Stoffe »lebend« nennen.*

Die Enzyme sind in Wasser löslich und gehen in dieser Lösung meistens durch engporige Filter von Biskuitporzellan hindurch. Bakterien werden dadurch zurückgehalten; es sind keine Organismen bekannt, welche so engmaschige Filter zu passieren vermöchten. Die Annahme eines colloidal gelösten lebenden Wesens ist kaum zulässig.

Wollte man die große Veränderlichkeit bzw. die chemische Aktivität der Enzyme als Zeichen ihres Lebens betrachten, so würden ebensogut Aldehyde, Diazoverbindungen, ja selbst anorganische Stoffe, Ferrosalze, Kaliumpermanganat und colloïdales

¹⁾ Die Lehre von den chemischen Fermenten, Heidelberg 1882, S. 120.

Platin, als lebend aufzufassen sein. Wie jene repräsentieren höchst wahrscheinlich auch die Enzyme chemische Individuen.

Diese Ausführungen könnten überflüssig erscheinen. In den letzten Wochen ist aber erst wieder eine Abhandlung veröffentlicht worden¹⁾, welche allen Ernstes die Meinung ausspricht, daß Enzyme etwas Lebendes seien²⁾, eine Betrachtungsweise, welche geradezu geeignet ist, die Entwicklung der biologischen Wissenschaft aufzuhalten. Denn ein Erkennen der komplizierten Lebenserscheinungen wird nur dadurch möglich, daß immer mehr einfache Prozesse davon abgesondert und für sich erforscht werden. Ist dieses Ziel in einem Falle erreicht, so heißt es jeden Fortschritt in Frage stellen, wenn unter Abänderung der Definition von »Leben« nun doch wieder nur von lebenden Teilchen gesprochen wird. Vielleicht erscheint es statthaft, daran zu erinnern, daß die Aufklärung der Verbrennungsvorgänge erst erfolgte, nachdem es Lavoisier gelungen war, die Oxydationsvorgänge zu trennen von Lichtbildung und Wärmeentwicklung. Beim Erhitzen von Quecksilber an der Luft entsteht ohne Auftreten von Licht und ohne bemerkbare Selbsterwärmung Quecksilberoxyd. Das war der Schlüssel zur Erkenntnis der komplizierten Verbrennungsercheinungen.

Auf einem so wenig geklärten Wissensgebiet, wie die Enzymforschung, ist es nicht wunderlich, in größtem Gegensatz zur Auffassung der Enzyme als lebende Wesen auch eine Hypothese von de Jager und später von Arthus vertreten zu sehen, welche denselben überhaupt die stoffliche Existenz abspricht und ihre Wirkungen durch eigentümliche physikalische Kräfte erklären will, die den betreffenden Materien anhaften. Diese Vorstellung konnte auftauchen, weil es bisher nicht gelungen ist, die Enzyme in reinem Zustand abzuscheiden, sondern immer nur verunreinigt mit einer Menge anderer Stoffe. Sie trägt aber ent-

¹⁾ Hugo Fischer, Privatdocent der Botanik in Bonn, Centralbl. für Bakteriologie II. Abt. 9, S. 353 (1902).

²⁾ Um Verwirrung zu verhüten, sollten auch Ausdrücke wie »töten« oder »vergiften« eines Enzyms, die leider noch sehr gebräuchlich sind, vermieden werden. Leblose, chemische Stoffe kann man nur zerstören oder verändern.

schieden einen abenteuerlichen Zug an sich und läßt unerklärt, warum die einzelnen Umsetzungen mit wenigen Ausnahmen nur durch ganz bestimmte Enzyme bewirkt werden. Auch spricht die Abscheidungsart der Enzyme im Tier- und Pflanzenkörper gegen eine solche Auffassung. Solange es nicht möglich ist, die verbreitetsten Eiweißkörper rein darzustellen, wird man bei der Labilität der meisten Enzyme auch begreiflich finden, daß eine Isolierung derselben noch fehlt, und trotzdem an der einfachen Vorstellung festhalten dürfen, daß es sich um bestimmte chemische Individuen handelt.

Bezüglich der Konstitution der Enzyme ist nur sicher, daß sie sehr komplizierten Bau und asymmetrische Konfiguration besitzen. Letzteres wurde von Emil Fischer zunächst für einige hydrolytische, Zucker spaltende Enzyme und für Emulsin durch das verschiedene Verhalten gegenüber optischen Antipoden, was nur bei selbst optisch aktiven Verbindungen denkbar erscheint, nachgewiesen. Da aber die Enzyme komplizierte Produkte der Organismen vorstellen, ist für alle Asymmetrie wahrscheinlich.

Die Wirkungsweise der Enzyme, dadurch charakterisiert, daß sich diese Stoffe an der Reaktion scheinbar nicht beteiligen und quantitativ unverhältnismäßig große Umsetzungen zustande bringen, muß, wie schon Berzelius erkannte, der Wirkung mancher Kontaktsubstanzen oder Katalysatoren der anorganischen Chemie an die Seite gestellt werden. Diese beschleunigen wie die Enzyme nach Ostwald langsam verlaufende chemische Vorgänge durch ihre Gegenwart¹⁾. Unter den Katalysatoren zeigen insbesondere die colloidalen Lösungen mancher Metalle auffallend analoge Wirkungen mit Enzymen. Schon Schönbein²⁾ hat die Zerlegung des Hydroperoxyds (Wasserstoffsperoxyd) durch fein verteiltes Platin das »Urbild aller Gärungen« genannt. Größte Ähnlichkeit zwischen colloidaler Platinflüssigkeit und Enzymlösungen, die beide als mikroheterogene Suspensionen äußerst

¹⁾ Über Katalyse, Vortrag auf der 73. Naturforscher-Versammlung zu Hamburg, 1902, S. 12.

²⁾ Journal f. prakt. Chemie (1) 89, S. 324.

feiner Teilchen unter der Gröfse der Lichtwellen zu betrachten sind, konnte neuestens G. Bredig¹⁾, zum Teil unterstützt von Müller von Berneck, Ikeda und Reinders, gegenüber dem schädlichen Einflufs des Zusatzes von Elektrolyten, welcher den colloidalen Zustand beeinträchtigt, und bei der Koagulation konstatieren. Es scheint, dafs die ungeheure Oberflächenentwicklung sowohl des colloidalen Platins wie der Enzymsuspensionen, und ihre Fähigkeit, gewisse Stoffe chemisch durch Komplexbildung oder durch Adsorption, vielleicht auch infolge ihrer Halbdurchlässigkeit für dieselben, zu binden, die katalytische Beschleunigung mancher Reaktionen veranlafst²⁾. Dafs die Oberflächenspannung auch bei manchen leicht zu überblickenden, rein chemischen Reaktionen zur Auslösung derselben eine grofse Rolle spielt, ist bekannt; ein neueres Beispiel dafür bietet der Einflufs von unglasierten Porzellanstückchen auf die Bildung von Polymethylen aus Diazomethan unter Stickstoffabspaltung³⁾.

Für die Platinkatalyse des Hydroperoxyds nimmt Haber und ebenso Bredig⁴⁾ die intermediäre Bildung einer Platinsauerstoffverbindung an, welche dann weiteres Hydroperoxyd zerlegt, unter Sauerstoffentwicklung und Regenerierung von Platin. Auch das verschiedene Verhalten mancher Enzyme gegen spiegelbild-isomere Zucker ist wohl nur erklärlich, wenn vorübergehend Verbindungen zwischen dem asymmetrischen Enzym und dem optisch aktiven Kohlenhydrat, also Zwischenprodukte, auftreten. Die Annahmen von solchen hat die neueste Auffassung der Enzymwirkungen gemein mit viel älteren Vorstellungen darüber von Bunsen und von Hüfner⁵⁾, welche zum Vergleiche das Verhalten des Stickoxyds bei der Schwefelsäurefabrikation und seinen intermediären Übergang in Dioxyd

¹⁾ Zeitschr. f. physikal. Chemie 31, S. 268, 352; Physikal. Zeitschrift 2, 7 und Bredig, anorgan. Fermente, Leipzig 1901, S. 84.

²⁾ G. Bredig, Anorganische Fermente 1901, S. 18.

³⁾ E. Bamberger, Berichte d. d. chem. Ges. 33, S. 956 (1900); vgl. auch Skraup, Monatsh. f. Chemie 1891, S. 107, Berichte d. d. chem. Ges. 32, 1889 Anm. 2 (1899).

⁴⁾ A. a. O. S. 94.

⁵⁾ Journal f. prakt. Chemie (2) 10, 148, 385 (1874).

bezw. Nitrosylschwefelsäure heranzogen. Es steht zu hoffen, daß der rätselhafte Schleier, der auch heute noch über den Enzymwirkungen lagert, auf physikalischem und auf rein chemischem Wege weiter gelüftet wird.

Das Agens im Hefesaft ist kein lebendes Protoplasma.

Das wirksame Prinzip des Prefsaftes erweist sich, wie die Enzyme, unempfindlich gegen Zusatz gewisser Mittel, welche die Lebenstätigkeit von Organismen ausschließen¹⁾. Besonders lehrreich erscheint das Verhalten gegenüber Toluol, welches in 1proz. Lösung die Wirkung lebender Hefezellen auf Zucker völlig unterbindet, dagegen die Gärkraft des Hefesaftes kaum schädigt. Charakteristischerweise wird ferner die Gärwirkung des Saftes durch Zusatz von 40% Rohrzucker im ganzen nicht verringert und nur wenig verlangsamt gegenüber 20proz. Zuckerlösung. Lebende Hefe ist jedenfalls in einer 40proz. Rohrzuckerlösung überhaupt nicht mehr imstande, deutliche Gärung zu veranlassen. Sollten im Prefsaft lebende Protoplaststückchen die Ursache der Gärkraft repräsentieren, so bleibt unverständlich, daß dieselben, obwohl sie des Schutzes der Zellwand und des Plasmaschlauches entbehren, weniger empfindlich sind als die Zellen selbst.

Das Agens im Prefsaft wird durch Zusatz von Alkohol und Äther als trockenes, amorphes Pulver niedergeschlagen, ohne an Wirkung einzubüßen²⁾; man kann dieses Verfahren sogar wiederholen. Da lebende Hefezellen durch dieselbe Behandlung sofort getötet werden, ist nicht einzusehen, wie nacktes Protoplasma dabei lebend bleiben sollte.

Das Gärungsagens ist weniger empfindlich gegen trockene Hitze und gegen Behandlung mit Alkohol oder Aceton und Äther als die Hefezellen. Aus den, durch eines dieser Verfahren, getöteten Organismen kann das wirksame Prinzip, nach dem Zerreiben, durch Wasser oder Glycerin ausgezogen werden

¹⁾ Ausführliche Versuche s. im IV. Abschnitt.

²⁾ S. den VI. Abschnitt.

und erweist sich als aktiv gegen Zucker. Aus toten Zellen kann doch kein lebendes Plasma in Lösung gehen?¹⁾

Wären im Hefesaft Protoplastmklümpchen vorhanden, könnten dieselben wahrscheinlich abzentrifugiert werden, da es gelingt, Hefezellen und Bakterien auf diese Weise abzuscheiden. Zur Prüfung²⁾ wurde der Saft in langen Röhren der Wirkung einer Zentrifuge von 1500 Umdrehungen in der Minute 1—1½ Stunden lang unterworfen und hernach die oberste und die unterste Schicht durch Zucker- und Toluolzusatz geprüft; dabei war kein Unterschied in der Gärkraft zu konstatieren.

Der Hefeprefssaft stellt eine im durchfallenden Lichte kaum sichtbar getrübe Flüssigkeit vor; vollkommen klar erscheint die stark gärkräftige Lösung, welche aus getöteter und hernach zerriebener Dauerhefe durch Wasser oder verdünntes Glycerin ausgezogen werden kann. Der Hefeprefssaft kann durch Chamberland-Biskuit-Porzellanfilter filtriert werden³⁾, ohne von seiner Wirkung, wenn derselbe Saft schon vorher durch ein gröberes Kieselgurfilter gegangen war, mehr als ein Viertel einzubüßen. Wollte man lebende Plasmastückchen als Agens im Prefssaft betrachten, so müßten dieselben in gelöster Form vorhanden sein. Die Annahme einer lebenden Flüssigkeit, die mit Wasser mischbar wäre, würde etwas vollkommen Neues⁴⁾ bedeuten und dürfte kaum mit den übrigen physiologischen Vorstellungen vereinbar sein. Alles deutet darauf hin, daß Leben nur bei organisierter Struktur, also bei festem Zustand der maßgebenden Bestandteile vorhanden ist. Man wird im Gegenteil geneigt sein, den festen Zustand als Charakteristikum der Organismen aufzufassen, hinter dem vielleicht jene Eigenschaften schlummern, welche uns das Leben augenblicklich noch schwer verständlich erscheinen lassen. Nach van 't Hoff⁵⁾ sind wir über das

¹⁾ Vergl. den VII. Abschnitt.

²⁾ S. im III. Abschnitt.

³⁾ S. die ausführlichen Versuche darüber im III. Abschnitt.

⁴⁾ Vergleiche darüber J. Reynolds Green, „Nature“ 1900, 106.

⁵⁾ Über die zunehmende Bedeutung der anorganischen Chemie, Vortrag auf der Düsseldorfer Naturforscherversammlung 1898, Zeitschr. f. physikal. Chemie 18, Heft 1.

Wesen der Materie unterrichtet im gasförmigen und im flüssigen Aggregatzustand. Vielleicht ermöglicht gerade jene eigentümliche Kombination von Festem und Flüssigem, wie er in der organisierten Struktur vorliegt, ausschliesslich die Lebensvorgänge. Eine Substanz, die nicht wächst und sich nicht vermehrt und ausserdem auch keine organisierte Struktur aufweist, wird man getrost als tot bezeichnen dürfen¹⁾.

Einen Unterschied zwischen Gärung und Enzymwirkung hat man auch darin erblicken wollen, dass bei letzterer Molekül für Molekül glatt gespalten wird, während bei dem Zerfall des Zuckers durch Hefe nicht nur Alkohol und Kohlensäure entstehen, sondern auch noch geringe Mengen von Nebenprodukten, hauptsächlich Glycerin (ca. 3%) und Bernsteinsäure (0,6%). Nach Nägeli²⁾ wird diese Verschiedenheit begreiflich, wenn die Gärung nicht durch eine Kontaksubstanz, sondern durch das lebende Plasma bewirkt wird. »Die organisierte Substanz mit ihren mannigfaltigen Molekularbewegungen und Molekularkräften« soll eine kompliziertere Zersetzung hervorbringen. Die Untersuchung, ob bei der zellenfreien Gärung auch jene Nebenprodukte erscheinen, wird experimentell durch die geringe Menge jener Stoffe und die grosse Masse von beigemengten Substanzen, aus welchen sie schliesslich ausgezogen werden müssen, ausserordentlich erschwert. Es konnte aber doch nachgewiesen werden, dass die Glycerinbildung mit der alkoholischen Gärung, d. h. dem Zerfall des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure durch Einwirkung des Agens im Prefsaft sehr wahrscheinlich nichts zu tun hat, also bei der Gärung durch lebende Hefe auf Rechnung der gegenwärtigen Organismen zu setzen ist und mit den Assimilationsvorgängen zusammenhängt. Bezüglich der Bildung von Bernsteinsäure haben die bisherigen Versuche noch kein endgültiges Resultat ergeben; voraussichtlich wird es sich damit genau ebenso verhalten.

¹⁾ Adolf Mayer, Agrikulturchemie, 5. Aufl. 1902, III, 182 schreibt: »In den Hefezellen ist eine noch als organisiert zu betrachtende Substanz enthalten, welche die Gärung als solche einzuleiten vermag« Mir scheinen die obigen Tatsachen auszuschliessen, dass das Agens »organisiert« sei.

²⁾ Theorie der Gärung, München 1879, 16.

Auch einige physiologische Gründe sprechen noch dagegen, das Agens im Prefsaft direkt als lebendes Protoplasma zu betrachten. Nägeli¹⁾ hat gezeigt, daß die Hefezellen infolge allmählich gesteigerter nachteiliger Einflüsse zuerst die Gärwirkung und dann bei weiterer Schädigung erst Wachstums- und Lebensfähigkeit einbüßen. Eine Veränderung des Gesamtprotoplasma der Zellen schon in dem Augenblick, wo die Gärwirkung aufhört, ist daher kaum anzunehmen; es werden sich nur Teile verändert haben²⁾. Umgekehrt gelingt es auch, die Gärkraft der Hefe durch Züchten in starker Zuckerlösung bei Mangel an Stickstoffnahrung und Luftzutritt zu heben³⁾. Eine Veränderung des gesamten Protoplasma wird man dabei kaum annehmen wollen; die Vorstellung ist viel einfacher, daß nunmehr ein bestimmter Stoff in reichlicherer Weise produciert wird⁴⁾.

Aus all' den angeführten Gründen scheint mir mit Sicherheit hervorzugehen, daß im Prefsaft kein lebendes Agens vorhanden ist. Wollte man trotzdem an der Vorstellung von lebenden Plasmastückchen als Träger der Gärkraft festhalten, so müßte das Leben anders definiert werden als bisher; man müßte annehmen, daß es unter Bedingungen erhalten bleiben kann, die man früher nicht für möglich hielt, und beschließen, daß Stoffe, die bisher für tot galten, nun plötzlich als lebend betrachtet werden sollen. Damit führt die Frage immer mehr auf einen Wortstreit hinaus und spitzt sich darauf zu, was man lebend nennen will. Daß auch von maßgebender pflanzenphysiologischer Seite diese Anschauung geteilt wird, ergibt sich aus Äußerungen W. Pfeffer's nach einer Demonstration der zellenfreien Gärung in der botanischen Sektion der Münchner Naturforscher-Versammlung 1899:⁵⁾

¹⁾ Die niederen Pilze, München 1877, 27.

²⁾ Auf Grund dieser Tatsachen hat Oscar Loew bereits 1886 als Sitz der Gärtätigkeit in der Hefezelle eine besondere Plasmaabteilung, den Zymoplasten, bezeichnet [Journ. f. prakt. Chemie 33, 351 (1886); Centralbl. f. Bakteriologie 9, 659 (1891)].

³⁾ Hayduck, Wochenschrift f. Brauerei, 1884, No. 16, 26, 46.

⁴⁾ Siehe auch die Mitteilungen über Zymasebildung in der Hefe im VIII. Abschnitt.

⁵⁾ Verhandlungen d. Ges. d. Naturforscher u. Ärzte 1899, II, 1, 210.

»Wir müssen für den sicheren Nachweis dankbar sein, daß die Zerspaltung des Zuckers in der Alkoholgärung durch einen enzymartig wirkenden Körper bewirkt wird. Auf die Möglichkeit und Wahrscheinlichkeit eines solchen Verhältnisses habe ich schon in der II. Auflage meiner Physiologie (Bd. I, S. 559) hingewiesen. Es ist aber von höchster Bedeutung, daß Herr Buchner den empirischen Beweis erbracht hat, daß es sich um ein Enzym handelt, das auch getrennt von der lebendigen Zelle zu wirken vermag, daß also ein analoges Verhältnis besteht, wie in Bezug auf den Erreger der Harnstoffgärung, aus dem Miquel das wirksame Enzym isolierte. Wie in anderen Fällen ist somit gekennzeichnet, daß der Organismus einen Stoff produciert, um mit dessen Hilfe eine bestimmte Umsetzung, eine bestimmte physiologische Funktion zu vollbringen. Jedenfalls handelt es sich dabei (wie bei allen spezifischen Enzymen) um distinkte chemische Körper (oder Gemische), die noch nach völliger Vernichtung des Lebens und der Organisation wirksam sind. Es ist also physiologisch nicht nötig, anzunehmen, daß in dem Prefsaft organisierte Protoplasmafetzen vorhanden und wirksam sind.«

Das Gärungsagens im Hefeprefsaft hat den Namen *Zymase* erhalten, gebildet aus ζύμη Sauerteig (ζύμωσις ich setze in Gärung) und den Endsilben »ase«, die Duclaux¹⁾, ferner O'Sullivan und Tompson²⁾ für die Körperklasse der Enzyme zur Erinnerung an die Entdeckung des ersten hierhergehörigen Stoffes, der Diastase, durch Payen und Persoz in Vorschlag gebracht haben. Der Name Zymase ist schon älterer Herkunft; er wurde ursprünglich von Béchamp einer Art von Invertase zuerteilt und später dann allgemein für Enzyme angewandt, ist jetzt aber seit vielen Jahren nicht mehr in Gebrauch. Der Name »Alkoholase«, in Frankreich mehrfach üblich, wurde, abgesehen von seinem für deutsche Ohren wenig schönen Klang, verworfen, weil Äthylalkohol auch mittels Spaltpilzen aus Glycerin erhalten

¹⁾ Vgl. Bourquelot, les Ferments solubles Paris 1896, S. 4; Effront, les Enzymes, Paris 1899, S. 60.

²⁾ Journal of the chem. Soc. 57, S. 835 (1890).

werden kann, wobei vielleicht ein von der Zymase verschiedenes Enzym in Tätigkeit tritt; ferner ist es neuestens gebräuchlich, die Enzyme nach den Stoffen zu nennen, auf welche sie einwirken, nicht nach den Produkten, welche durch sie entstehen. Der allgemeinere Name Zymase schien gerechtfertigt; denn wie die alkoholische Gärung des Zuckers seit langem als Typus aller Gärungserscheinungen gilt, hat man hier anscheinend den ersten Repräsentanten einer größeren Gruppe von Enzymen gefasst.

Bemerkt sei noch, daß ich mit dem Namen Zymase niemals den Hefeprefssaft als solchen, sondern immer nur das spezielle Gärungsagens im Hefesaft bezeichnet habe, im Gegensatz zu anderen Autoren, die sich darin einer weniger genauen Ausdrucksweise bedienen¹⁾.

Vergleich der Zymase mit den übrigen Enzymen.

Muß nach dem eben Ausgeführten die Enzymtheorie, für welche Moritz Traube so mutig eingetreten ist, im wesentlichen als richtig betrachtet werden, so bleibt doch fraglich, ob die Zymase den schon länger bekannten Enzymen direkt zugezählt werden darf. Wenngleich sie im Verhalten gegen anti-septische Mittel den übrigen Enzymen gleicht und wie diese durch Alkohol und Äther aus der wäßrigen Lösung niedergeschlagen und in trockenes Pulver verwandelt werden kann, so scheint sie doch wegen ihrer großen Veränderlichkeit — der Prefssaft verliert schon bei mehrtägigem Aufbewahren seine Wirkung — und weil sie nicht diffundiert, eine besondere Stellung einzunehmen. Es soll nun hier zunächst eine Übersicht über die Eigenschaften der Zymase gegeben und passende andere Enzyme zum Vergleiche herangezogen werden.

Der gärwirksame Saft aus Unterhefe läßt beim Erwärmen schon zwischen 40 und 50° reichlich geronnene Eiweißkörper zu Boden fallen und das Filtrat von diesen besitzt keine Gärkraft mehr. Vielleicht wird das wirksame Agens durch jene

¹⁾ A. Macfadyen, G. H. Morris und S. Rowland, Berichte der d. chem. Ges. 33, S. 2764, 2772; A. Macfadyen, Centralblatt f. Bakteriologie I. Abt. 30, 368 (1901); Adolf Mayer, Agrikulturchemie 5. Aufl. 1902, III, S. 177; S. Rosenberg, Deutsche Ärzte-Zeitung, Berlin 1902, Nr. 17.