

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 11 (1920)
Heft: 5-6

Artikel: Physiologisch-chemische Studien an der Hefezelle
Autor: Schweizer, Karl / Schaffer, F.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-984229>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 05.05.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

MITTEILUNGEN
AUS DEM GEBIETE DER
LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE
VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT
TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE
ET D'HYGIÈNE

PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE

ABONNEMENT: Schweiz Fr. 10. — per Jahrgang. — Suisse fr. 10. — par année.
Preis einzelner Hefte Fr. 1. 80. — Prix des fascicules fr. 1. 80.

BAND XI

1920

HEFT 5/6

Physiologisch-chemische Studien an der Hefezelle.

Von KARL SCHWEIZER.

(Aus dem Laboratorium des Eidg. Gesundheitsamtes, Vorstand: F. Schaffer.)

I. Verwendung des Präzipitometers und eines Katalasebestimmungsapparates zur Verfolgung des Gärungsverlaufes.

Die Aufgabe der experimentellen Physiologie besteht bekanntlich in der Analyse der Lebensäusserungen. Um aber einigermaßen eindeutige Resultate zu erhalten, sollten solche Versuche immer zuerst mit möglichst einfachen Organismen angestellt werden, bevor man sie auf höhere Lebewesen, bei denen die Verhältnisse immer komplizierter werden, überträgt. Die einfachsten Verhältnisse finden wir nun aber wohl bei den Einzellern,¹⁾ zu denen auch die Hefe gehört. Dieselbe hat ausserdem noch den Vorteil, dass sowohl ihre Vermehrung als auch die Entwicklung von Kohlensäureanhydrid bei der Vergärung von Zucker leicht messbare Funktionen sind und uns gestatten, quantitative Vergleiche zu ziehen.

Wir wissen, dass die Vermehrung der Hefezellen sowohl durch Sporenbildung als auch durch Sprossung vor sich gehen kann. Wenn sich unter normalen Bedingungen eine relativ kleine Anzahl von Hefezellen in einem Medium befindet, das eine hinreichende Menge von Zucker und sonstigen notwendigen Nährstoffen enthält, so kann man annehmen, dass die Vermehrung vorwiegend durch Sprossung stattfindet, das heisst nach einer anfänglichen Auftreibung des einzelligen Organismus entsteht eine neue Zelle, welche schliesslich durch eine Querwand gegen die Mutterzelle abgeschieden wird.

¹⁾ Es wird allerdings auch angenommen, dass die Zellen höherer Lebewesen einfacher organisiert sein könnten, da sie nicht sämtliche Funktionen des ganzen Organismus in sich vereinigen.

Zur experimentellen Feststellung der Hefevermehrung kommen alle die Verfahren in Betracht, welche überhaupt zur quantitativen Bestimmung von einzelligen Organismen brauchbar sind. Wir können einmal die Zellen direkt zählen,¹⁾ indem wir die von Koch für Bakterien eingeführte Kultur in Petrischalen verwenden. Mit derselben stellen wir aber nur die Anzahl lebender Hefezellen fest, während die Methode von Klein darin besteht, sowohl tote als auch lebende Zellen zu zählen. Diese Art der Bestimmung der Zellenvermehrung ist wohl einwandfreier als die erstere. Nun kann aber die Hefevermehrung auch durch Feststellen der Zunahme an Gesamtmasse wahrgenommen werden, ohne zu wissen, wie viel einzelne Zellen dieselbe enthält. Namentlich beim Arbeiten mit grösseren Hefemengen und wenn der Wassergehalt der Hefe jedesmal genau bestimmt wird, ist das Abscheiden der Hefe durch Zentrifugieren oder Abfiltrieren und nachheriges Wägen wegen seiner grossen Einfachheit sehr zu empfehlen. Rubner hat zur Bestimmung der Hefemenge auch eine chemische Methode angewandt, nämlich die Bestimmung des Stickstoffs nach *Kjeldahl*.

Viel schneller als diese Methode ist aber das Ablesen des durch **Zentrifugieren** abgeschiedenen Volumens. Diese Bestimmung eignet sich namentlich zum Feststellen von Vergleichswerten. Dabei muss natürlich darauf geachtet werden, dass immer gleich grosse Flüssigkeitsmengen während gleichen Zeiträumen bei gleicher Tourenzahl in gleich grossen Behältern zentrifugiert werden. Carlson hat zu diesem Zwecke den Hämatokrit verwendet, der von Hedin für die quantitative Bestimmung von Blutkörperchen vorgeschlagen wurde. Es ist dies ein trichterförmiger, in eine unten geschlossene Kapillare endigender Apparat, in welchem die zu untersuchende Hefeaufschlemmung mit einprozentiger Sodalösung zentrifugiert wird. Die Zellen treten dann unter dem Einfluss der Zentrifugalkraft in die mit einer Graduierung versehene Kapillare ein, wo ihr Volumen abgelesen werden kann.²⁾ In einer kürzlich erschienenen Abhandlung empfiehlt *Dichtl*³⁾ ein ähnliches Sedimentierverfahren sogar zur Bestimmung der Keimzahl, und zwar bei Bakterien. Von dichten Aufschwemmungen zentrifugierte er einerseits 0,01 cm³ in Trommsdorf- oder Rosenthalschen Röhrchen und verarbeitete andererseits 0,1 cm³ unter entsprechender Verdünnung zu Agarplatten. Mit zunehmendem Alter der Kulturen liess sich nun ein Ansteigen der Anzahl lebender Individuen in der Volumeinheit des Zentrifugates beobachten, bis ein Maximum erreicht ist. Von da an sinkt diese Zahl wieder mit der weiteren Dauer der Bebrütung. Wenn die Bakterien bei 37° gezüchtet wurden, so war die Maximalzahl der lebenden Individuen in der Volumeinheit Sediment sehr bald erreicht; sie ist verhältnismässig niedrig und hält sich nur kurze Zeit konstant, um dann rasch zu sinken. Erfolgt die Züchtung aber bei 22° (es handelt sich

¹⁾ Vergl. *Hebewerth*, Arch. f. Hyg. **39**, 321 (1901).

²⁾ Vergl. *Euler* u. *Lindner*, Chemie der Hefe 259 (1915).

³⁾ Arch. f. Hyg. **89**, 47 (1919).

um *Mikrococcus pyogenes* und *Bacterium typhi murium*), so wird diese Maximalzahl später erreicht; sie ist im Vergleich zu den bei 37° gezüchteten Kulturen bedeutend höher und bleibt verhältnismässig lange auf ihrer Höhe, ehe sie abfällt.

Ich habe nun für meine Versuche das in der Serologie bekannte Präzipitometer verwandt, und zwar in der gleichen Form, wie sie Thöni¹⁾ bei seinen quantitativen Versuchen über Honigpräzipitine anwandte (Fig. 1). Ein Teilstrich des unteren graduierten Teiles dieser Apparate entspricht 1,5 mm³, der Durchmesser dieser Partie beträgt etwa 1—1,5 mm. Um vorerst ein Bild zu bekommen, wie sich die Hefe beim Zentrifugieren im Präzipitometer verhält, habe ich 1 g Presshefe des Handels mit zirka 75 % Wassergehalt in 100 cm³ Wasser gründlich verrührt und dann während einer Stunde im Schüttelapparat tüchtig geschüttelt. Von dieser Hefeaufschlemmung wurde je 1 cm³ mit 0,5 cm³ zehnprozentiger Sodalösung verschieden lange und bei verschiedenen Tourenzahlen im Präzipitometer zentrifugiert. Bei Presshefe und vollständig vergorenen Flüssigkeiten erwies sich zwar der Zusatz von Alkali als überflüssig, wogegen man bei noch in Gärung befindlichen Lösungen ohne Alkali nur eine unvollständige Sedimentierung erhält, wahrscheinlich infolge der aufsteigenden Kohlensäurebläschen. Um aber immer möglichst gleiche Bedingungen einzuhalten, setzte ich in allen Fällen den erwähnten halben Kubikzentimeter Sodalösung zu. Der erste orientierende Versuch ergab folgende Resultate:



Fig. 1.

(Natürliche Grösse)

Dauer des Zentrifugieren	Tourenzahl	Sedimentiertes Hefevolumen in Teilstrichen des Präzipitometers angegeben	
		1. Versuch	2. Versuch
1. 15 Min.	2000	6,0	6,2
2. do.	1000	6,8	6,9
3. 5 Min.	2000	7,0	7,0
4. do.	1000	ca. 6,5	ca. 5,0

Eine Tourenzahl von 1000 während 5 Min. hat sich als zu wenig wirksam erwiesen, da so keine deutlich abgegrenzte Sedimentierung erhalten wurde. Wenn man jedoch die Dauer auf eine Viertelstunde verlängert, so erhält man vollkommen befriedigende Resultate; diese Manipulation lässt sich also auch mit der primitivsten Laboratoriumszentrifuge vornehmen. Um die Operation aber möglichst schnell auszuführen und in möglichst kurzer Zeit möglichst viele Bestimmungen vornehmen zu können, empfiehlt

¹⁾ Mitt. Lebensm. u. Hyg. 2, 118 (1911).

es sich, das Zentrifugieren bei 2000 Touren während 5 Min. vorzunehmen. Auf diese Weise verfuhr ich denn auch bei den weiteren Versuchen.

Zur Orientierung habe ich nun vorerst mit dieser Methode die Hefebildung bei einem normalen Gärungsverlauf verfolgt. Zu diesem Zwecke wurde in zwei Parallelversuchen je ein Erlenmeyer von zirka 500 cm³ mit 200 cm³ ungehopfter Bierwürze von 10 % Ball. beschickt und mit 20 cm³ einer Hefeaufschwemmung geimpft. Letztere wurde durch Schütteln während einer Stunde im Schüttelapparat von drei Oesen (Durchmesser 5 mm) einer acht Tage alten Kultur von *Saccharomyces cerevisiae* in 100 cm³ physiologischer Kochsalzlösung (0,85 %) erhalten; 5 cm³ derselben entsprechen einem Teilstrich des Präzipitometers nach Zentrifugieren bei 2000 Touren während 5 Min., so dass diese Suspension in der beimpften Würze verteilt nur noch ein unmessbares Zentrifugat ergeben würde. Zur Kontrolle wurde die Hefesuspension auch mit der Plattenkultur ausgezählt und eine Zellenzahl von 350 000 im Kubikzentimeter gefunden.

Täglich wurde nun, nach vorherigem Durchschütteln, je 1 cm³ des Erlenmeyerinhaltes entnommen, 0,5 cm³ zehnprozentige Sodalösung zugesetzt und während 5 Min. bei 2000 Touren zentrifugiert. Beim Umschütteln des Kolbeninhaltes wurde darauf geachtet, dass dies mit beiden Parallelversuchen gleich stark geschah, um eine ungleiche Sättigung mit Luft und damit ungleiche Begünstigung des Hefewachstums möglichst zu verhindern. Die erste Probe wurde bereits nach erfolgter Impfung entnommen, nicht wegen der zugesetzten Hefe, die ja nur ein minimales Volumen darstellt, sondern wegen Körnern, die aus der Würze ausfallen konnten, trotzdem dieselbe durch gewöhnliches Filtrierpapier filtriert worden war. Die Hefevolumen nahmen wie folgt zu:

Tag der Probenahme	Sedimentiertes Hefevolumen in Teilstrichen des Präzipitometers angegeben	
	1. Kolben	2. Kolben
0	ca. 1	ca. 1
1	1,5	1,5
2	5,0	5,0
3	7,0	7,0
4	8,5	8,5
5	8,5	8,5
6	8,5	8,5

Graphisch dargestellt sind diese Resultate in Fig. 2. Der Inhalt der Erlenmeyerkolben besass nach der Gärung in beiden Versuchen noch eine Konzentration von 3 % Ball.

Fig. 2 zeigt uns also den normalen Verlauf der Hefebildung, die sich sehr wahrscheinlich wie folgt abspielt: Solange Ueberschuss an Nahrung vorhanden ist, sprosst jede Zelle unabhängig von den anderen, so dass in

jedem Momente die Anzahl der in der Volumeinheit neu entstehender Zellen proportional ist mit der in diesem Zeitpunkt bereits vorhandenen Zellenzahl. Wenn gegen Ende der Gärung die Konzentration der Nahrungsstoffe sich erniedrigt oder Hemmungsstoffe, Gifte etc. gebildet werden, so macht sich eine Verzögerung des Wachstums bemerkbar, bis dasselbe zuletzt ganz stillsteht, was in dem horizontalen Verlauf der Kurve seinen Ausdruck findet. Dieses erreichbare Maximum ist von verschiedenen Faktoren beeinflussbar, wie zum Beispiel der Zusammensetzung der Nährlösung, der Toleranz der Hefe für Alkohol und ihrer Fähigkeit, den Stickstoff der Nährlösung auszunutzen.¹⁾ Auch der in der Würze vorhandene gelöste Sauerstoff ist bekanntlich von Einfluss auf das Hefewachstum. Die Vorgänge beim Absterben der Hefezellen sind übrigens noch wenig erforscht. *Slator*²⁾ hat kürzlich auch mittelst physikalisch-chemischer Methoden das Hefewachstum gemessen und einen ähnlichen Verlauf der Kurve erhalten. Letztere ist übrigens nicht nur für die Vermehrung der Hefezellen, sondern von Einzellern überhaupt charakteristisch.

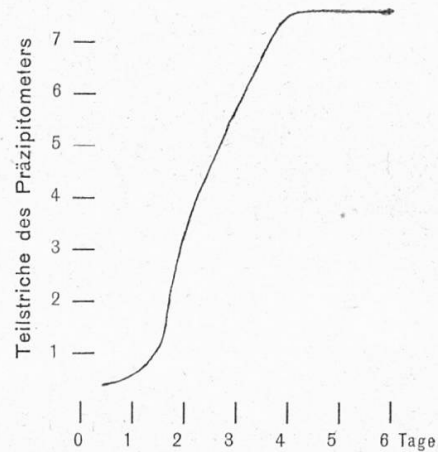


Fig. 2.

Ausser der Vermehrung der Hefemasse haben wir nun aber auch die **Kohlensäureentwicklung** als eine leicht zu verfolgende Funktion der Hefezelle erwähnt. *Slator*³⁾ hat gezeigt,

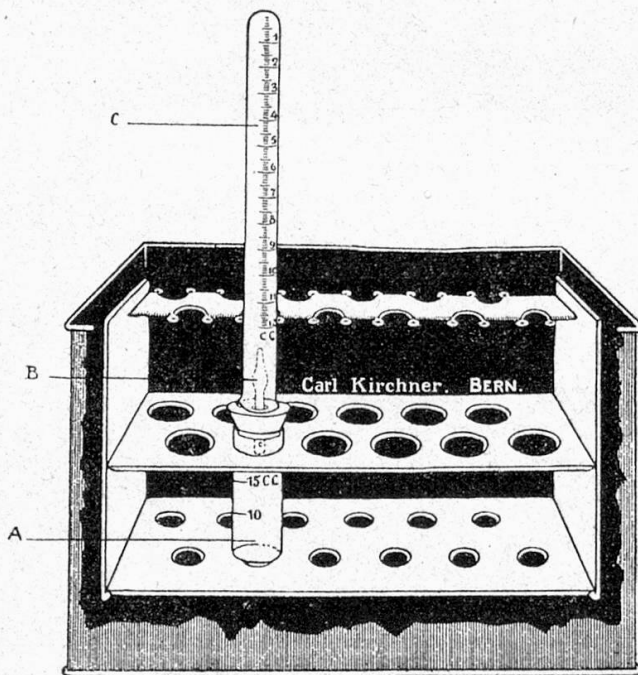


Fig. 3.

dass wenn die Gärleistung einer Zelle unter gegebenen Bedingungen konstant ist, man aus der Gärleistung einer Hefemasse sogar auf die Anzahl Zellen schliessen könnte. Da es nun bei physiologischen Studien immer wertvoll ist, möglichst viele Parallelversuche anstellen zu können, so suchte ich nach einer geeigneten Apparatur, die dies in einfacher Weise ermöglicht. Dazu schien mir der Apparat zur Bestimmung der Katalase in Milch usw. nach *Köstler*⁴⁾ (Fig. 3) ganz besonders geeignet. Die Grundidee desselben beruht auf der Eigen-

¹⁾ Vergl. *Euler* u. *Lindner*, Chemie der Hefe S. 255.

²⁾ Journ. Soc. Chem. Ind. **38**, R 391 (1919).

³⁾ Bioch. Journ. **7**, 197 (1913).

⁴⁾ Jahresbericht Molkerei Rütli 1909. (Bezugsquelle: *K. Kirchner*, Freiestr. 6, Bern.)

schaft kapillarendigender Röhren, sich unter Wasser bei gleichbleibenden Druckverhältnissen nicht mit Wasser zu füllen. Dieser Apparat besteht aus etwa 20 cm³ Inhalt aufweisenden Gärgläschen (Fig. 3, A), die mit einem zentral durchbohrten Gummistopfen verschlossen sind. In der Durchbohrung des Stopfens befindet sich ein nach aussen kapillar endigendes Glasröhrchen (Fig. 3, B), welches in der Nähe der kapillaren Oeffnung eine zitronenförmige Erweiterung besitzt. Nach der gegenüberliegenden Seite ist es sackartig geschlossen und ist dort seitlich mit einer Oeffnung versehen. Die mit der Reaktionsflüssigkeit gefüllten Gärgläschen werden mit dem Gummistopfen mit Kapillarröhrchen verschlossen und in einem besonderen Halter (siehe Fig. 3) in einer Blechwanne unter Wasser von der gewünschten Temperatur aufgestellt. Ueber die Kapillarröhrchen wird nun ebenfalls unter Wasser ein vorher mit Wasser gefülltes, mit dem Daumen an der Oeffnung zugehaltenes Messröhrchen (Fig. 3, C) gestülpt, welches vom geschlossenen Ende aus nach cm³ Innenraum graduirt ist. Das sich bildende Gas steigt dann in der Messröhre auf und verdrängt das darin befindliche Wasser nach unten. Die entwickelte Gasmenge lässt sich so zu jeder Zeit in cm³ ablesen. Die zitronenförmige Erweiterung, sowie der sackartige Abschluss an der Kapillare sollen das Eintreten von Wasser in die Gärflüssigkeit verhindern, was vorkommen könnte, wenn zum Beispiel durch plötzliche Temperaturerniedrigung der Gasdruck im Entwicklungsrohr ebenfalls erniedrigt würde. Wenn es sich um Feststellung von Vergleichswerten handelt, so kann man einfach gewöhnliches Wasser nehmen. Bei Gärversuchen, die genaue Werte ergeben sollen, muss das Wasser vorher mit Kohlensäure gesättigt werden.

Um nun diesen Apparat für meine Zwecke auszuprobieren, habe ich in 16 solcher Köstlerschen Gärgläschen je 10 cm³ ungehopfte Bierwürze, wiederum von einer Konzentration von 10 % Ball., gegeben und mit je 1 cm³ einer Hefensuspension beimpft. Letztere wurde auch wieder durch Schütteln während einer Stunde von drei grossen Oesen einer 12-tägigen Bierhefekultur mit 100 cm³ physiologischer Kochsalzlösung erhalten. Nachdem die Röhrchen mit den zugehörigen Stopfen verschlossen worden waren, wurden sie in die Wanne gebracht, die mit Kohlensäure gesättigtes Wasser enthielt, und dann die mit dem gleichen Wasser gefüllten Eudiometer darüber gestülpt.

Das Ablesen des entwickelten Kohlensäuregasvolumens wurde nun täglich um die gleiche Zeit vorgenommen und gleichzeitig auch je einem der Gläschen 1 cm³ seines Inhaltes entnommen und mit 0,5 cm³ zehnprozentiger Sodalösung während 5 Min. bei 2000 Touren zentrifugiert. Das so gestörte Gläschen wurde dann jeweils von der weiteren Beobachtung ausgeschlossen. Die so erhaltenen Resultate sind auf S. 199 zusammengestellt.

Der Versuch verlief bei einer Zimmertemperatur, die tagsüber meistens etwa 22° C. betrug. Das zu Beginn des Experimentes festzustellende Präzipitat rührt fast ausschliesslich von der Würze her; es konnte übrigens nicht sehr deutlich abgegrenzt erhalten werden.

Tag der Probenahme	Teilstriche des Präzipitometers		Mittel aller in Beobachtung befindlichen Gläschen an entwickeltem Kohlensäureanhydrid in cm ³
	1. Versuch	2. Versuch	
0	ca. 1	ca. 1	0
1	»	»	0,8
2	2	2	1,2
3	2	2	11,3
4	2	2	29,6
5	2	2	41,1
6	2	2	51,2
7	5	5	57,8
8	5	6	59,0
9	3	3	61,6
10	5	5	62,8
11	5	5	63,4

Der Verlauf der Kohlensäurebildung ist in Fig. 4 dargestellt. Diese Kurve deckt sich nicht ganz mit derjenigen des Hefezuwachsvolumens. Die Gasentwicklung dauert viel länger an, wenn sie auch längere Zeit nur noch sehr schwach weitergeht. Es kommt eben hier neben der Zunahme der Hefenzellen auch noch die Wirkung der gebildeten Zymase zum Ausdruck, die immer noch weiter wirkt, wenn das Wachstum bereits zum Stillstand gelangt ist.

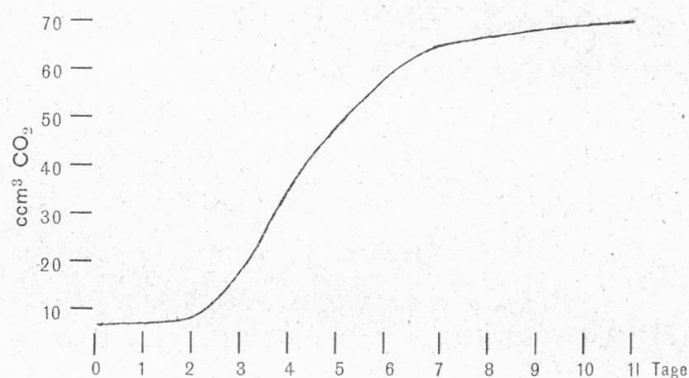


Fig. 4.

Sowohl in Bezug auf das Hefevolumen als auch in Bezug auf die entwickelte Kohlensäuremenge wiesen übrigens die einzelnen Versuchsgläschen grosse Unterschiede auf, wie dies aus folgender Zusammenstellung (S. 200) der im vorangehenden Versuch gebildeten Gasmengen der einzelnen Proben hervorgeht.

Solche Unregelmässigkeiten wurden kürzlich von *Cardot* und *Richet*¹⁾ auch bei Milchsäurebakterien beobachtet. Diese Autoren nehmen an, dass dieselben nicht physikalischen oder chemischen Ursachen zugeschrieben werden können, sondern eher einer Individualität der einzelnen Zelle. Dieselbe kann zum Beispiel in der verschiedenen Widerstandsfähigkeit der einzelnen Mikroben gegen toxische Einflüsse bestehen, denn diese Autoren zeigen, dass in einer Nährlösung, die mit einem zum ersten Male auf das Milchsäurebakterium einwirkenden Antiseptikum versetzt ist, in verschie-

¹⁾ Ann. Inst. Pasteur 33, 575 (1919).

denen Proben ein sehr verschiedenes Wachstum eintritt, während eine an dieses giftige Medium längere Zeit angewöhnte Rasse darin nur kleinere Abweichungen vom Mittelwert zeigt.

Tag der Ablesung	Nummern der Versuchsgläschen															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2		0,4	3,2	0,3	1,0	2,2	3,0	1,4	2,2	0,5	4,0	9,0	5,0	1,4	5,0	3,0
3			20,5	13,5	5,2	5,1	13,5	24,0	7,5	13,3	13,0	8,0	12,7	4,3	7,0	16,0
4				43,5	9,2	20,9	41,5	67,0	11,5	29,1	32,9	19,0	49,1	6,3	8,2	56,4
5					12,2	27,9	46,5	92,0	16,5	41,1	43,9	29,5	70,1	7,8	16,5	79,4
6						33,5	58,5	96,3	21,1	52,1	57,9	41,5	80,5	9,3	24,3	88,3
7							61,2	96,6	25,6	53,7	71,2	52,5	82,8	10,6	24,8	89,3
8								96,8	30,6	54,9	73,5	62,5	84,0	11,6	26,9	89,8
9									36,8	55,6	74,5	75,4	84,9	11,9	30,5	90,0
10										55,9	74,8	80,4	85,1	12,4	33,1	90,0
11											75,1	82,9	85,3	12,6	33,6	90,0

Wir sehen also, dass nur eine grössere Anzahl von Parallelversuchen uns auf die richtigen Mittelwerte führen kann. Um aber dennoch rasch arbeiten zu können, benötigt man eine möglichst einfache Apparatur. Aus den oben mitgeteilten Versuchen geht hervor, dass zur Verfolgung der Kohlensäureentwicklung bei der alkoholischen Gärung der Katalaseapparat von Köstler sehr gut geeignet ist. Wenn es sich aber um die Bestimmung des gebildeten Hefevolumens handelt, so ist wohl das Abzentrifugieren in graduierten Röhrchen, wie zum Beispiel dem Präzipitometer, allen anderen Methoden an Einfachheit und Schnelligkeit überlegen.

II. Anwendung der typischen Vitamindemonstrationen auf die Hefezelle.

Die sogenannten Vitamine, die ja bereits im Jahre 1912 von Funk¹⁾ aus Hefezellen isoliert worden waren, scheinen wie bei anderen Mikroorganismen²⁾ auch bei der Hefe eine bedeutende Rolle zu spielen. Diesen Eindruck bekommt man wenigstens, wenn man die zahlreichen Arbeiten, die in der letzten Zeit über diese Frage veröffentlicht worden sind, durchliest. Es seien hier nur einige wenige herausgegriffen!

Wir wissen, dass die Hefe eine der beliebtesten Vitaminquellen für therapeutische Präparate geworden ist. Die Chemische Industrie A. G. in Basel³⁾ zieht zum Beispiel zu diesem Zwecke autolytierte Hefe mit verdünntem Alkohol aus, worauf sie den Alkohol im Vakuum abdestilliert und den wässerigen Rückstand hierauf mit Bleizucker bei saurer Reaktion und nach erfolgter Filtration mit Bleiessig bei neutraler Reaktion behandelt. Die so vorbereitete Lösung wird filtriert und dann im Vakuum zur Trockne

¹⁾ Journ. of Physiol. 45, 75 (1912).

²⁾ Vgl. Schweizer, Schweiz. Chem. Ztg. 424 (1919).

³⁾ D. R. P. 311, 074 (1916).

eingedampft. Man soll so ein Produkt erhalten, das in Wasser leicht löslich ist und die typischen Eigenschaften der Vitamine besitzt. Bosshard und Hefti¹⁾ stellen ein Arzneimittel gegen Avitaminosen her, indem sie vitaminreiche Proteinsubstanzen, insbesondere auch Hefe, mit verdünnten Mineralsäuren bei etwa 80° bis zum Aufhören der Biuretreaktion behandeln, worauf das Produkt filtriert und dann das Filtrat von der Mineralsäure befreit wird. Nun können die in ihm enthaltenen Aminosäuren noch in ihre Kalzium- oder Natriumsalze übergeführt werden, worauf bei möglichst niedriger Temperatur zur Trockne eingedampft wird.

An Stelle von autolysierter Hefe kann aber auch getrocknete Hefe genommen werden. *Sugiura*²⁾ hat dieselbe in Wasser aufgeschlemmt und dann diese Aufschlemmung in einem Dialysierschlauch an der Luft aufgehängt, bis dessen Inhalt vollständig eingetrocknet war. Er will dann auf der Aussenseite des Dialysierschlauches eine krystallinische Substanz gefunden haben, die Vitamineigenschaften besitzen soll. Diese Resultate konnte ich bisher nirgends bestätigt finden und ist aus der mir zugänglichen Litteratur nicht ersichtlich, ob dieser Versuch unter Ausschluss der Mikroorganismen der Luft vorgenommen worden ist. Ein orientierendes Experiment hat mir nämlich gezeigt, dass sich beim Aufhängen des Dialysierschlauches an der freien Luft sehr bald allerlei Mikroorganismen auf dessen Aussenfläche entwickeln, die von den dialysierenden Autolyseprodukten ernährt werden. In diesem Falle wäre es möglich, dass die Vitamine von diesen Organismen erst wieder synthetisiert würden, so dass also diese Versuchsanordnung nicht etwa auf eine Dialysierbarkeit der Hefenvitamine zu prüfen und deren einfache Isolierung gestatten würde. Ein anderes Verfahren beschreiben *Myers* und *Vægtlin*³⁾, wonach sie Trockenhefe mit mittels Salzsäure schwach angesäuertem Methylalkohol am Rückflusskühler ausziehen, dann filtrieren und mit Methylalkohol nachwaschen, und schliesslich die Filtrate im Vakuum bei 35° einengen. Die so konzentrierten Filtrate werden nun mit einem grossen Ueberschuss von Silberazetatlösung versetzt und mit Bariumhydroxydlösung deutlich alkalisch gemacht. Die auf diese Weise erzeugte Fällung enthält das Vitamin und wird zur Reinigung in Wasser aufgeschlemmt, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Hierauf wird abfiltriert, im Vakuum eingedampft und die Schwefelsäure durch Bleiazetat entfernt. Aus dem Konzentrat wird das Histidin mittels Quecksilbersulfat entfernt, und dann durch Zusetzen von absolutem Alkohol ein Niederschlag erzeugt. Zum Entfernen des Quecksilbers suspendiert man diesen Niederschlag wieder in Wasser und leitet Schwefelwasserstoff ein. Nach erfolgter Filtration wird die Schwefelsäure durch Bleiazetat gefällt und das Blei mittels Schwefelwasserstoff entfernt. Durch Einengen im Vakuum erhält man dann eine Lösung, welche sehr

¹⁾ D. R. P. 320, 785 (1920).

²⁾ Journ. Biol. Chem. **36**, 191 (1918).

³⁾ Journ. Biol. Chem. **42**, 199 (1920).

aktiv gegen Vogelpolyneuritis ist. Wenn man unter vermindertem Druck über Natronkalk weiter konzentriert, so entstehen Kristalle, welche in ihrer Mutterlauge wirksam sind, dagegen ihre physiologische Wirksamkeit verlieren, wenn sie mit Alkohol gewaschen und hierauf getrocknet wurden. Hierbei ändert sich die Krystallform. Dieses Resultat scheint also mit dem oben angeführten von Sugiura in Widerspruch zu stehen.

Auch Abderhalden¹⁾ hat die Frage geprüft, ob es möglich ist, der Hefe die wirksamen Stoffe, denen er den neuen Namen Nutramine zulegt, zu entziehen, ohne sie vorher einer besonderen Aufschliessung zu unterwerfen. Aus an der Luft getrockneten Hefen waren aber diese Stoffe weder mit absolutem Alkohol, noch mit Azeton, noch mit einem Gemisch von absolutem Alkohol und Azeton vollständig entfernbar. Dieser Verfasser nimmt daher an, dass es einen in diesen Lösungsmitteln löslichen und einen unlöslichen Anteil von Nutraminen gebe.

Nun sind aber die Hefen nicht nur Vitaminlieferanten, sondern ihr Wachstum wird von denselben auch beeinflusst, wie dies bei höheren Organismen der Fall ist. Williams²⁾ hat zum Beispiel Parallelversuche in Kulturmedien von chemisch genau definierter Zusammensetzung mit und ohne Zusatz von vitaminreichen Präparaten angestellt, wobei er feststellte, dass in ersterem Falle die Vermehrung der Hefe viel lebhafter ist als in dem vitaminlosen Medium. Es handelt sich dabei aber nur um den wasserlöslichen Faktor von Mc. Collum und Davis, der sich ja bekanntlich auch in der Hefe selbst vorfindet, während der in diesen Mikroorganismen nicht vorhandene fettlösliche Faktor auch keinen Einfluss auf deren Wachstum hat. Dieser Verfasser macht schon darauf aufmerksam, dass die Hefe infolge ihrer Empfindlichkeit gegenüber Vitamin als Reaktiv auf den Faktor B Verwendung finden könnte. Die für diese Versuche verwendeten Präparate scheinen aber so komplexer Natur zu sein, dass die Resultate wohl noch nicht als eindeutig angesehen werden dürfen. Auch Abderhalden und Koehler³⁾ haben unter der Einwirkung von alkoholischem Hefeextrakt eine ganz bedeutende Begünstigung der Zellteilung im hängenden Tropfen beobachtet. Grössere Mengen von Hefeextrakt können allerdings auch hemmend wirken und ausserdem sind verschiedene Heferassen gegenüber verschiedenen Konzentrationen auch verschieden resistent. Der Einfluss des Hefeextraktes lässt sich auch dadurch nachweisen, dass in Versuchen, bei denen gleiche Hefemengen mit gleichen Kohlenhydratmengen versetzt und immer, wenn die Entwicklung der Kohlensäure stark abgenommen hat, neuer Zucker zugefügt wird, bis nach weiterem Zusatz die Gärung nicht mehr wesentlich in Gang zu bringen ist, bei Zusatz von Hefeextrakt viel mehr Zucker vergoren wird als in dem Parallelversuch, der ohne diesen Zusatz geblieben ist.⁴⁾

¹⁾ Arch. der Physiol. **176**, 260 (1920).

²⁾ Journ. Biol. Chem. **38**, 465 (1919).

³⁾ Arch. der Physiol. **176**, 209 (1919).

⁴⁾ Fermentforschung **3**, 44 (1919).

Alle diese Arbeiten zeigen also, welche Wichtigkeit den Vitaminen auch bei der Hefephysiologie zukommt. Ich versuchte nun die drei typischen Vitamindemonstrationen in ganz grober Analogie auch auf die Hefezelle anzuwenden, indem ich dabei die in der ersten Mitteilung beschriebene Versuchsanordnung verwendete.

Wir haben bereits oben gesehen, welchen Einfluss **alkoholischer Hefeextrakt** auf die Hefeorganismen hat. Folgende Versuche beruhen auf der von Stepp im Jahre 1909 gemachten Beobachtung, dass wenn man Mäusen mit Alkohol extrahiertes Brot als alleinige Nahrung verabreicht, die Tiere nach einiger Zeit zugrunde gehen, während nicht extrahiertes Brot eine vollkommen ausreichende Nahrung darstellt. Dasselbe ist der Fall, wenn man dem extrahierten Brot seinen eigenen alkoholischen Auszug wieder zusetzt.

Ich ging bei vorliegenden Versuchen immer von autolysierten Hefen aus, die ich nach Vansteenberghe (1917) so bereitete, dass ich jeweils einen Block von 50 gr Presshefe während 1—2 Tagen bei 48—49° verflüssigte. Aus diesem Autolysat wurde nun einmal ein Präparat hergestellt, das in den folgenden Versuchen als Vergleichsmaterial dienen sollte und sämtliche Bestandteile der Hefe enthielt, das heisst das gesamte Selbstverdaungsprodukt wurde im Vakuum bei 50° getrocknet. Ich erhielt so aus 50 gr Presshefe 13 gr eines hellbraunen Pulvers.

Mit einer zweiten Portion Hefeautolysat nahm ich die Trennung in alkohollöslichen und alkoholunlöslichen Anteil vor. 50 gr verflüssigte Presshefe wurde zu diesem Zwecke mit 100 cm³ konzentriertem Alkohol versetzt und gut durchgemischt. Beim Alkoholzusatz war die Bildung eines Niederschlages zu beobachten. Den Alkoholauszug befreite ich von den unlöslichen Bestandteilen durch Filtrieren an der Saugpumpe, worauf dann der Rückstand wieder aus der Nutsche herausgenommen wurde und zum Nachwaschen noch zweimal mit je 50 cm³ konzentriertem Alkohol aufgeschlemmt und wieder filtriert wurde. Der Filtrerrückstand wurde bei 50° getrocknet und ergab auf diese Weise 8 gr eines braunen Pulvers, während das braun gefärbte Filtrat nach Verdampfen im Vakuum, ebenfalls bei 50°, 4,5 gr einer dunkelbraunen Substanz ergab. Die Summe dieser beiden Substanzen entsprach also beinahe dem erhaltenen Gewicht von vollständigem Autolysat, so dass bei der Trennung in die beiden Anteile nur ein kleiner Verlust eingetreten war.

Ich wollte nun in erster Linie feststellen, ob auch der Nährwert dieser beiden Anteile demjenigen des Gesamtautolysates entspreche. Eine Zuckerlösung gibt ja mit Hefe allein, vorausgesetzt, dass dieselbe nur in kleiner Quantität zugesetzt wird, keine Gärungserscheinung, während durch Zusatz von autolysierter Hefe das denkbar günstigste Nährmedium geschaffen wird. Ich stellte nun folgende Lösungen her:

1. Zehnprozentige Saccharoselösung in destilliertem Wasser.

2. Hefesuspension, erhalten durch Schütteln in der Schüttelmaschine während 1 Stunde von drei Oesen (Durchmesser 5 mm) einer 10 Tage alten Kultur von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen mit 100 cm³ isotonischer Kochsalzlösung. (5 cm³ dieser Hefesuspension geben beim Zentrifugieren im Präzipitometer bei 2000 Touren während 15 Minuten ein Volumen von 1 Teilstrich = 1,5 mm³. 1 cm³ = 610,000 Zellen).

3. Zehnprozentige Lösung von getrocknetem Hefeautolysat in destilliertem Wasser. (Die erhaltene Lösung ist nicht klar und besitzt eine braune Farbe).

4. Fünfprozentige Lösung von bei der Alkoholextraktion verbleibendem Rückstand, die ebenfalls trübe ist und eine graue Farbe besitzt.

5. Fünfprozentige Lösung von getrocknetem Alkoholextrakt in destilliertem Wasser. Derselbe gibt eine klare, braun gefärbte Lösung und hinterlässt gleichzeitig einen klebrigen, unlöslichen und nicht aufschlembaren Rückstand.

In einem erstem Versuch wurden nun in vier Parallelversuchen je 10 cm³ der Saccharoselösung mit 1 cm³ der Hefesuspension beimpft und dann noch 1 cm³ der Lösung des vollständigen Autolysates und 1 cm³ destilliertes Wasser hinzugefügt. Die Gärung dieses Gemisches wurde in dem in der ersten Mitteilung beschriebenen Köstler'schen Katalaseapparat vorgenommen und folgende Kohlensäureanhydridmengen, in Kubizentimetern gemessen, erhalten:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 2 Tagen:	0,05	0,1	0,1	0,05
» 4 »	71,5	81,2	58,0	70,2
» 6 »	114,0	141,4	116,1	131,3

Mittel nach 6 Tagen: 125,7 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Wurde nun aber an Stelle von vollständigem Autolysat 1 cm³ der Lösung von mit Alkohol extrahierter Hefe genommen, so entwickelten sich nur die folgenden Kohlensäurevolumen:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 2 Tagen:	0,1	0,3	0,1	0,2
» 4 » :	10,4	7,2	9,7	7,1
» 6 » :	21,6	19,8	27,0	20,0

Mittel nach 6 Tagen: 22,1 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Mit 1 cm³ der Alkoholextraktlösung als Nährstoffzusatz waren die entsprechenden Werte folgende:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 2 Tagen:	0,3	0,05	0,2	0,2
» 4 » :	10,4	3,4	2,6	3,4
» 6 » :	57,9	27,0	8,8	10,8

Mittel nach 6 Tagen: 26,1 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Wenn man nun endlich sowohl 1 cm³ der Lösung von mit Alkohol ausgezogener Hefe als auch 1 cm³ der dabei erhaltenen Alkoholextrakt-

lösung zu der Zuckerlösung zufügte und, um das gleiche Flüssigkeitsvolumen innezuhalten, den Zusatz von 1 cm³ destilliertem Wasser unterliess, so entwickelten sich wieder folgende Kohlensäuremengen, in Kubikzentimeter gemessen:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 2 Tagen:	0,3	0,2	1,2	0,2
» 4 » :	43,4	26,6	25,7	32,5
» 6 » :	123,4	117,0	102,1	126,4

Mittel nach 6 Tagen: 117,2 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, dass die Summe der Wirkungen von mit Alkohol extrahierter Hefe und dem Alkoholauszug geringer ist, als diejenige des gesamten Hefeautolysates, die ungefähr derjenigen entspricht, die man durch Wiedervereinigung des alkohollöslichen und alkoholunlöslichen Anteiles erzielt.

Weniger deutliche Resultate ergab hingegen das gleichzeitige Messen des gebildeten Hefevolumens. Beim Zentrifugieren von je 1 cm³ der Gärflüssigkeit mit 0,5 cm³ zehnprozentiger Natriumkarbonatlösung im Präzipitometer während 5 Minuten bei 2000 Touren wurden folgende Volumen in Teilstrichen des Präzipitometers abgelesen:

	a) Mit Hefeautolysat	b) Mit mittels Alkohol extrah. Hefe	c) Mit Alkohol- auszug	d) Mit b und c gleichzeitig
Nach 2 Tagen:	15	20	3	16
» 4 » :	20	14	2	14
» 6 » :	32	16	2	22

Diese Unregelmässigkeiten beruhen darauf, dass schon die Zusätze nicht vollständig löslich waren und sich infolgedessen beim Zentrifugieren ebenfalls zu Boden setzten. Es war auch nicht möglich, einfach eine Bestimmung im Präzipitometer beim Ansetzen der Versuche vorzunehmen, da von den unlöslichen Bestandteilen während der Gärung noch ein Teil gelöst werden konnte, wie aus einigen der obigen Versuche, die eine Abnahme des Volumens feststellen lassen, ersichtlich ist. Es wäre noch das Filtrieren übrig geblieben, doch wollte ich dasselbe vorläufig unterlassen, da man konstatiert haben will, dass vitaminartige Körper von Filtrierpapier absorbiert werden können.

Analoge Versuche wurden auch noch mit stärkeren Hefeverdünnungen sowohl als auch schwächeren Zuckerkonzentrationen vorgenommen, doch erwiesen sich die oben beschriebenen Bedingungen als am vorteilhaftesten sowohl in Bezug auf Deutlichkeit als auch auf Geschwindigkeit.

Es war nun auch noch festzustellen, ob die mit Alkohol extrahierte Hefe oder der Hefeextrakt im Stande seien, in einem vollständig ausreichenden Gärmedium noch eine Beschleunigung nach Art der Vitaminwirkung hervorzurufen. Diese Gärflüssigkeit war in allen Fällen wie folgt zusammengesetzt:

10 cm³ zehnprozentige Zuckerlösung
 1 » einer zehnprozentigen Hefeautolysatlösung
 1 » einer Hefesuspension von 19 Tage alter *Saccharomyces*kultur
 in physiologischer Kochsalzlösung.

Dazu wurde nun einmal je 1 cm³ einer Lösung von mit Alkohol ausgezogener Hefe in verschiedenen Konzentrationen zugefügt und auf diese Weise folgende Kohlensäurevolumen erhalten:

Konzentration der Lösung von mit Alkohol ausgezogener Hefe:				
	5 %	2,5 %	1,25 %	0 %
Nach 1 Tag:	0	0	0	0
» 2 Tagen:	1,6	3,1	0,7	0,2
» 4 » :	4,0	5,5	2,5	2,0
» 5 » :	20,5	19,0	19,0	23,9
» 6 » :	51,7	49,8	47,8	66,7

Es ist also eher eine Hemmung zu beobachten, wie dies auch bei den weiter vorne angeführten Versuchen von *Abderhalden* der Fall war, wenn er zu grosse Extraktmengen zusetzte.

Ein analoger Versuch mit Alkoholextrakt ergab folgende Kohlensäuregasmengen:

Konzentration der Alkoholextraktlösung:				
	5 %	2,5 %	1,25 %	0 %
Nach 1 Tag:	0	0	0	0
» 2 Tagen:	1,5	0,5	0,5	1,0
» 4 » :	3,2	3,3	3,3	3,0
» 5 » :	39,7	24,0	15,0	13,5
» 6 » :	91,3	73,6	51,8	47,9

Mit dem Alkoholextrakt aus Hefe lässt sich also eine Beschleunigung konstatieren, welche aber immer noch durch dessen Nährwert erklärt werden kann.

In der Absicht, auch die Hefebildung während der Gärung beobachten zu können, wiederholte ich vorstehende Versuche mit filtrierten Lösungen. Die Verhältnisse blieben alle die gleichen wie in den vorangehenden Versuchen, nur dass die Lösungen von Hefeautolysat, alkoholextrahierter Hefe und Hefeextrakt zuerst ein Filter Nr. 575 von *Schleicher* und *Schüll* passieren mussten. Das Alter der Hefekultur betrug diesmal 14 Tage. Unter diesen Umständen wurden mit Hefeautolysat folgende in Kubikzentimetern angegebenen Kohlensäuremengen erhalten:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 3 Tagen:	5,3	3,4	5,5	5,0
» 4 » :	15,1	18,2	23,9	18,0
» 5 » :	32,9	36,2	44,7	40,0
» 6 » :	51,5	53,2	61,3	60,2

Mittel nach 6 Tagen: 59,9 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Der Zusatz von einer filtrierten Lösung von mit Alkohol extrahiertem Autolysat, an Stelle des vollständigen Selbstverdauungsproduktes, ergab folgende Zahlen:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 3 Tagen:	1,7	0	0,2	0
» 4 » :	3,5	0,5	1,2	0,5
» 5 » :	4,9	1,3	3,6	0,5
» 6 » :	5,7	3,1	4,9	0,8

Mittel nach 6 Tagen: 3,6 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Wenn man nun je 1 cm³ filtrierte Lösung von in destilliertem Wasser gelöstem Alkoholextrakt zufügte, so wurden folgende Kohlensäuremengen entwickelt:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 3 Tagen:	8,0	9,0	7,5	8,0
» 4 » :	21,0	32,8	17,3	15,4
» 5 » :	37,8	54,3	38,9	30,0
» 6 » :	55,1	70,4	56,7	36,0

Mittel nach 6 Tagen: 54,5 cm³ Kohlensäureanhydrid.

In einer vierten Versuchsreihe wurde wiederum der alkohollösliche Teil mit dem alkoholunlöslichen zusammen verwendet und auf diese Weise folgende Zahlen erhalten:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 3 Tagen:	0,5	1,2	3,2	2,2
» 4 » :	1,7	3,5	13,6	6,8
» 5 » :	2,4	6,6	32,6	12,3
» 6 » :	3,0	15,0	52,0	20,1

Mittel nach 6 Tagen: 22,5 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Die erhaltenen Resultate sind also in diesem Falle nicht sehr deutlich und bedürfen noch einer Nachprüfung. Das gleiche ist der Fall, wenn man gleichzeitig das gebildete Hefevolumen misst, denn es wurde erhalten:

	a) Mit Hefe-autolysat	b) Mit mittels Alkohol extrah. Hefe	c) Mit Alkohol-extrakt	d) Mit b und c gleichzeitig
Nach 3 Tagen:	1,0	0,5	3,0	1,0
» 4 » :	3,0	0,5	3,0	2,0
» 5 » :	3,0	0,5	3,5	2,5
» 6 » :	3,0	0,5	3,5	2,5
		*	*	

Eine andere Vitamindemonstration, die übrigens in der chronologischen Reihenfolge an erster Stelle steht, da sie bereits 1897 von *Eykman* angewendet wurde, besteht darin, dass mit geschältem Reis ernährte Vögel Erscheinungen unvollständiger Ernährung zeigen und krank werden, während die Kontrolltiere, die ungeschälten Reis erhalten, vollständig gesund bleiben. Trotzdem nun die Reiskleie an und für sich kaum einen

Nährwert hat, ist sie dennoch befähigt, die mit geschältem Reis hervorgerufenen Krankheitserscheinungen zu heilen, wenn man sie dieser Nahrung wieder zusetzt.

Ich nahm nun auch bei der Hefe eine ähnliche Trennung in **Membrane** und Zellinhalt vor. Bekanntlich bleibt bei der Selbstverdauung der Hefe die Zellhaut sowieso ungelöst zurück, so dass ich also das Hefeautolysat einfach viermal mit je 50 cm³ destilliertem Wasser auszog. Es wurde jedesmal in einer Reibschale mit dem Pistill gut verrieben, um eine innige Mischung zu haben und dann das Lösliche vom Unlöslichen durch Zentrifugieren während 15 Minuten bei einer Tourenzahl von 3000 getrennt. Die Verwendung eines Filters wurde vermieden, um nicht etwa Verluste durch Absorption im Filtrierpapier zu haben. Der erste wässrige Auszug ist noch gelb gefärbt, während beim vierten Extrakt kaum mehr eine Färbung zu beobachten ist. Eine Probe des Wasserextraktes wurde durch Papier filtriert, ohne einen sichtbaren Rückstand zu hinterlassen. Ich war hier wiederum von 50 g Presshefe ausgegangen und hatte nach dem Trocknen bei 50° des unlöslichen Rückstandes 4 g einer glasigen braunen Substanz erhalten. Der wässrige Extrakt ergab nach Eindampfen im Vakuum bei 50° bis zur Trockne 7 g eines kleberigen, braunen Präparates.

Um auch diese Anteile des Hefeautolysates auf ihre physiologische Wirksamkeit gegen den Hefeorganismus prüfen zu können, bereitete ich mir folgende Lösungen:

1. Wieder eine zehnprozentige Saccharoselösung in destilliertem Wasser.
2. Eine Hefeauspension, wie bei den vorangehenden Versuchen, nur dass diesmal die Hefekultur ein Alter von 7 Tagen hatte.
3. Zehnprozentige Lösung von getrocknetem Hefeautolysat als Vergleichsmateriel.
4. Vierprozentige Aufschlemmung von Hefezellmembranen.
5. Siebenprozentige Lösung von getrocknetem Wasserextrakt.

Es wurden nun wieder vier Parallelversuche angestellt, indem Köstlersche Gärröhrchen mit je 10 cm³ Saccharoselösung, 1 cm³ Hefesuspension, 1 cm³ Autolysatlösung und 1 cm³ destilliertem Wasser beschickt wurden. Nachdem die Röhrchen mit ihrem zugehörigen Stopfen verschlossen worden waren, wurde in der Blechwanne die mit kohlensäurehaltigem Wasser gefüllten Eudiometer darüber gestülpt und folgende Kohlensäureentwicklung (in cm³) beobachtet:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 2 Tagen:	0	0	0	0
» 3 » :	6,7	3,0	3,5	4,0
» 4 » :	30,9	20,4	23,7	27,4

Mittel nach 4 Tagen: 25,6 cm³ Kohlensäureanhydrid.

In einer zweiten Versuchsserie wurde die Lösung des vollständigen Autolysates durch 1 cm³ der Membranenaufschwemmung ersetzt und folgende Gasmengen erhalten:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 2 Tagen:	0	0	0	0
» 3 » :	0,1	0	0	0
» 4 » :	0,2	0	0,4	0

Mittel nach 4 Tagen: 0,15 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Weiter wurde an Stelle des vollständigen Autolysates auch 1 cm³ der Lösung von getrocknetem wässerigem Auszug genommen, was folgendes Bild ergab:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 2 Tagen:	0	0	0	0
» 3 » :	1,5	0,5	0,3	0,6
» 4 » :	5,1	2,8	3,6	5,8

Mittel nach 4 Tagen: 4,3 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Wenn man nun endlich sowohl 1 cm³ der Membranenaufschlemmung als auch 1 cm³ der Wasserauszuglösung zusetzte und zum Ausgleich des Flüssigkeitsvolumens den Zusatz von 1 cm³ destilliertem Wasser unterliess, so konnte die Wirkung des gesamten Verflüssigungsproduktes wieder hergestellt werden:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 2 Tagen:	0	0	0	0
» 3 » :	4,7	5,0	3,7	6,4
» 4 » :	35,5	29,8	22,1	34,6

Mittel nach 4 Tagen: 30,5 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Diese Resultate sind nun sehr auffallend, da man nicht erwarten konnte, dass die unlöslichen Membranen, die an und für sich kaum einen Nährwert haben, von so grosser Bedeutung bei der Ausnutzung des Hefeinhaltes sind.

Ebenfalls einen Unterschied, aber bedeutend weniger deutlich, konnte man beobachten, wenn man auch das mit dem Präzipitometer abzentrifugierbare Volumen an Hefe und unlöslichen Bestandteilen verglich:

	a) Mit Hefe-autolysat	b) Mit Zellmembranen	c) Mit Zellinhalt	d) Mit b und c zusammen
Am Anfang:	16	12	0,5	16
Nach 6 Tagen:	21	15	4,5	20
Volumenzuwachs:	5	3	3,5	4

Es wurde nun wiederum geprüft, ob die Zellmembranen oder der Zellinhalt die Fähigkeit haben, in einer bereits alle notwendigen Bestandteile enthaltenden Gärlösung noch eine Beschleunigung der Gärtätigkeit der Hefen hervorzurufen.

Dieses Gärmedium war wie folgt zusammengesetzt:

10 cm³ zehnprozentige Saccharoselösung;

1 » » Hefeaufschwemmung;

1 » einer Hefesuspension von 14 Tage alter Saccharomyceskultur, in isotonischer Kochsalzlösung.

Ausserdem wurde nun auch noch 1 cm³ Membranenaufschlemmung zugefügt, und dann im Köstlerschen Apparat folgende Kohlensäuremengen beobachtet:

Konzentration der Membranenaufschlemmung :

	4 ‰		2 ‰		1 ‰		0 ‰	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Nach 1 Tag:	0	0	0	0	0	0	0	0
» 2 Tagen:	1,5	0,7	2,2	0,6	1,8	3,0	0,6	1,2
» 3 » :	34,5	31,1	48,4	40,8	37,8	38,0	32,4	38,4
» 4 » :	85,7	81,1	105,6	92,8	85,8	76,4	78,0	86,4
Mittel:	83,4		99,2		81,1		82,2	

Es lässt sich also hier keine deutliche Wirkung beobachten, während bei Zusatz von 1 cm³ Zellinhaltlösung an Stelle der Membranenaufschwemmung ein gewisser Nährwert mit Optimum festzustellen ist, wie aus den folgenden Zahlen hervorgeht:

Konzentration der Lösung des wässerigen Auszuges :

	7 ‰		3,5 ‰		1,75 ‰		0 ‰	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Nach 1 Tag:	0	0	0	0	0	0	0	0
» 2 Tagen:	2,8	2,0	0,6	2,5	1,8	2,0	2,0	3,1
» 3 » :	44,8	47,6	46,0	51,5	46,2	46,2	39,0	42,8
» 4 » :	97,6	94,8	96,4	106,3	94,2	99,0	69,0	92,7
Mittel:	96,2		101,3		96,6		85,8	

Ausserdem wurde auch hier noch eine Versuchsreihe angestellt, bei der sämtliche Lösungen, mit Ausnahme der Zuckerlösung und der Hefesuspension, zuerst durch ein Papierfilter Nr. 575 von *Schleicher* und *Schüll* filtriert worden waren. In jedes Gärröhrchen wurden 10 cm³ Saccharoselösung, 1 cm³ Hefesuspension einer 11 Tage alten Kultur in physiologischer Kochsalzlösung, sowie 1 cm³ zehnprozentige Hefeautolysataufschwemmung gebracht und folgende Kohlensäuremengen erhalten:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 3 Tagen:	2,0	1,9	1,9	0,7
» 4 » :	4,5	14,9	4,4	2,9
» 5 » :	7,8	33,9	11,9	6,1
» 6 » :	19,3	35,1	25,1	21,4

Mittel nach 6 Tagen : 25,2 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Wenn man an Stelle des Autolysates 1 cm³ vierprozentige Zellmembranenaufschlemmung verwendet, so werden folgende Zahlen erhalten:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 3 Tagen :	0,4	0,1	0,3	0,1
» 4 » :	1,8	0,7	0,8	0,8
» 5 » :	2,9	1,9	3,4	1,6
» 6 » :	4,1	2,6	4,3	3,4

Mittel nach 6 Tagen : 3,6 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Durch Ersetzen des Autolysates durch 1 cm³ siebenprozentige Lösung des wässerigen Extraktes wurden folgende Gasvolumen erhalten:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 3 Tagen :	0,3	0,2	0,3	0
» 4 » :	1,6	1,7	1,0	0,5
» 5 » :	3,2	3,8	5,4	2,9
» 6 » :	4,6	7,6	18,6	11,6

Mittel nach 4 Tagen : 10,6 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Wenn man nun wiederum sowohl 1 cm³ der filtrierten Membranenaufschlemmung als auch 1 cm³ der filtrierten Lösung von Zellinhalt zugab, so wurden wieder folgende Kohlensäuremengen erzielt:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 3 Tagen :	2,1	1,8	3,0	0,5
» 4 » :	15,1	19,8	18,0	13,5
» 5 » :	29,1	47,8	42,0	27,5
» 6 » :	41,7	66,5	57,4	55,1

Mittel nach 6 Tagen : 55,2 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Diese Resultate zeigen also ebenfalls deutliche Unterschiede; auffallend ist, dass die mit dem Zellinhalt wieder vereinigten Membranen sogar eine stärkere Wirkung haben, als das direkt verwendete Gesamtautolysat. Wahrscheinlich rührte die zu ihrer Herstellung verwendete Presshefe nicht aus der gleichen Fabrikation her. Aehnliche Resultate ergab das gleichzeitig vorgenommene Messen des gebildeten Hefevolumens:

	a) Mit Gesamt- autolysat	b) Mit Mem- branen	c) Mit Zellinhalt	d) Mit b und c gleichzeitig
Nach 0 Tagen :	0,5	1,0	0	1,0
» 3 » :	2,0	1,5	0,5	2,0
» 4 » :	2,0	1,5	1,5	2,5
» 5 » :	2,0	1,5	1,5	4,0
» 6 » :	2,0	1,5	1,5	4,0

* *

Die dritte typische Vitamindemonstration beruht nun bekanntlich auf der Beobachtung, die 1901 von Gryns gemacht wurde, dass eine als vollständig genügend erprobte Nahrung, Wachstumshemmung, Abmagerung und schliesslich Tod erzeugt, wenn sie vorerst im Autoklaven auf 120° erwärmt wird. Da in letzter Zeit öfters Stimmen laut wurden, dass 120° als Abtötungstemperatur für die Vitamine nicht ausreichend sei, so erhitzte ich

autolysierte Hefe auf 130° , und zwar während 2 Stunden. Man beobachtet dann einen starken, an Peptonisation erinnernden Geruch und erhält nach Eintrocknen auf dem Wasserbad 12 g einer braunen, schmierigen Masse, vorausgesetzt, dass man wieder von 50 g Presshefe ausgegangen ist.

Die Versuchsanordnung war wieder wie in den vorangehenden die folgende: Jedes Gärröhrchen empfing 10 cm^3 zehnprozentige Zuckerlösung, 1 cm^3 durch Schütteln während einer Stunde von drei Oesen (5 mm Durchmesser) einer 20 Tage alten Bierwürzeagarkultur von *Saccharomyces cervisiae* Hansen mit 100 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung erhaltenen Hefeaufschwemmung, sowie 1 cm^3 einer zehnprozentigen Aufschwemmung von getrocknetem Hefeautolysat, das wie bei den vorigen Versuchen hergestellt worden war. An den Eudiometern des Köstlerschen Apparates konnte mit diesen Gärmedien folgende Kohlensäuregasmengen abgelesen werden:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 1 Tag:	0	0	0	0
» 2 Tagen:	0,3	2,1	1,2	0,2
» 3 » :	36,8	40,6	29,2	25,4
» 4 » :	62,2	89,9	78,4	67,4

Mittel nach 6 Tagen: $74,7\text{ cm}^3$ Kohlensäureanhydrid.

Wenn nun aber nur $0,5\text{ cm}^3$ Autolysatlösung und dafür aber noch $0,5\text{ cm}^3$ einer zehnprozentigen Lösung von auf 130° erwärmt gewesenem Hefeverflüssigungsprodukt zugegeben wurde, so erhielt man im Mittel ungefähr das gleiche Resultat, wie aus nachstehender Aufstellung hervorgeht:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 1 Tag:	0	0	0	0
» 2 Tagen:	0,2	0,5	0,2	0,1
» 3 » :	39,4	34,5	25,2	28,1
» 4 » :	71,4	76,5	73,2	88,1

Mittel nach 4 Tagen: $77,3\text{ cm}^3$ Kohlensäureanhydrid.

Die Gärung war dagegen weniger intensiv, wenn man ausschliesslich auf 130° erhitztes Hefeautolysat, und zwar wiederum 1 cm^3 einer zehnprozentigen Lösung, zum Zucker zufügte. Die auf diese Weise erhaltenen Resultate sind hier zusammengestellt:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 1 Tag:	0	0	0	0
» 2 Tagen:	0	0,4	0,1	0,1
» 3 » :	29,8	12,2	16,1	15,7
» 4 » :	59,8	48,2	64,1	63,7

Mittel nach 4 Tagen: $58,9\text{ cm}^3$ Kohlensäureanhydrid.

Die gleichzeitige Verfolgung des Zuwachses an zentrifugierbarem Volumen von Hefezellen und unlöslichen Bestandteilen ergab in Teilstrichen des Präzipitometers folgende Werte:

	a) Mit nicht erhitztem Autolysat	b) Mit $\frac{1}{2}$ a und $\frac{1}{2}$ c	c) Mit auf 130° erhitztem Autolysat
Am Anfang:	16	17,5	19
Nach 4 Tagen:	27	24	21
Volumenzuwachs:	11	6,5	2,0

Die gleichen Versuche wurden nun nochmals wiederholt, indem aber diesmal die verschiedenen Selbstverdaungsprodukte nach erfolgter Lösung in destilliertem Wasser zuerst durch eine Filter No. 575 von Schleicher und Schüll geschickt wurden. Alle Verhältnisse blieben sonst die selben, nur dass das Alter der Hefekultur bei diesen Experimenten 9 Tage betrug. Mit dem nicht erhitzten Autolysat wurden in diesem Falle folgende Werte erhalten:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 3 Tagen:	4,0	4,4	1,8	3,5
» 4 » :	15,3	17,7	9,7	12,3
» 5 » :	30,9	32,9	22,9	21,2

Mittel nach 5 Tagen: 26,9 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Mit einem Gemisch von nicht erhitztem und erhitztem Hefeautolysat zu halben Teilen ergaben sich die hier angeführten Resultate:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 3 Tagen:	3,2	3,5	3,0	2,5
» 4 » :	9,9	13,0	9,5	15,7
» 5 » :	21,5	30,7	23,3	27,9

Mittel nach 5 Tagen: 25,8 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Wenn nun endlich nur vorerst auf 130° erhitzt gewesenes Autolysat in filtrierter Lösung zugesetzt wurde, so zeigten die Eudiometer des Köstlerschen Apparates folgendes Bild:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Nach 3 Tagen:	2,6	4,8	2,4	2,6
» 4 » :	9,6	15,4	11,4	8,6
» 5 » :	18,9	35,6	19,0	13,6

Mittel nach 5 Tagen: 24,2 cm³ Kohlensäureanhydrid.

Bei diesen Versuchen mit filtrierten Hefeautolysatlösungen lassen sich also keine ausgeprägten Unterschiede feststellen, was auch vom gleichzeitigen Zunehmen des abzentrifugierbaren Hefevolumens zu sagen ist, wie aus folgender Zusammenstellung zu entnehmen ist:

	a) Mit nicht erhitztem Autolysat	b) Mit $\frac{1}{2}$ a und $\frac{1}{2}$ c	c) Mit auf 130° erhitztem Autolysat
Nach 0 Tagen :	1	1	1
» 3 » :	2,0	2,0	2,0
» 4 » :	3,0	4,0	3,5
» 5 » :	3,0	4,0	3,5
	*	*	

Aus den oben mitgeteilten Versuchen geht also hervor, dass man die typischen Vitamindemonstrationen, wenn es sich vielleicht auch nur um eine grobe Analogie handelt, beim Hefeorganismus namentlich durch Beobachten der Gärtätigkeit zahlenmässig verfolgen kann. So wie Vögel, die mit geschältem Reis ernährt worden waren, Erscheinungen unvollständiger Ernährung zeigen, so hat das Hefeautolysat, das von den Membranen getrennt wurde, nur einen äusserst minimalen Nährwert, was auch von den Membranen allein zu sagen ist. Gibt man aber die beiden wieder zusammen, so haben sie wieder die gleiche Wirkung wie das ursprüngliche, vollständige Verdauungsprodukt. Diese Gesamtwirkung übertrifft die Summe der Einzelwirkungen der beiden getrennten Komponenten um das 5—6fache. — In analoger Weise, wie eine sich als vollständig erweisende Nahrung das Wachstum von Tieren hemmen kann, wenn sie vorerst auf 120° erwärmt wurde, so ist auch das Hefeautolysat ein weniger günstiger Nährstoff für die Hefe, wenn es auf 130° erhitzt worden war. — Ähnlich wie mit Alkohol ausgezogenes Brot für Mäuse eine nicht ausreichende Nahrung bildet, so beobachtet man auch, dass ein alkoholischer Extrakt des Hefeautolysates sowohl, als auch der dabei zurückbleibende Rückstand allein nur einen geringen Nährwert für die Hefe haben. Wenn man nämlich dieselben getrennt zu einer mit lebender Hefe versetzten Zuckerlösung hinzufügt, so werden Kohlensäuremengen entwickelt, deren Summen nur etwa $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ derjenigen entsprechen, die mit dem gesamten Selbstverdauungsprodukt erzielt werden können.

Wenn man ferner einer gärenden Lösung, die bereits alle notwendigen Stoffe enthält, noch Hefemembranen hinzufügt, so lässt sich keine deutliche Steigerung der Gärwirkung feststellen, während der Zellinhalt dieselbe bis zu einem gewissen Optimum begünstigt. Erhitztes Hefeautolysat wirkt nur wenig beschleunigend, während unter den gleichen Bedingungen die bei der Alkoholextraktion zurückbleibenden Hefeabbauprodukte eher Hemmung hervorrufen. Der alkoholische Extrakt selbst steigert dagegen die entwickelten Kohlensäureanhydridmengen proportional zu seiner Konzentration.

Diese Versuche, die vorläufig erst zur Orientierung dienen sollen, lassen noch gar keinen überzeugenden Schluss für die Existenz der hypothetischen Vitamine zu, da sie sich sehr leicht durch das von Liebig in die Agrikulturbio-logie eingeführte Gesetz vom Minimum erklären lassen, das bekanntlich besagt, dass der Ertrag einer Pflanze abhängig ist von dem notwendigen Nährstoff, der während der eigentlichen Entwicklung der Pflanze in geringster Menge zur Verfügung steht. Es ist hierbei gleich-

gültig, ob alle übrigen Nährstoffe ausreichend oder gar im Ueberfluss der Pflanze verabreicht werden. Solche Verhältnisse scheinen wir aber wohl auch bei den hier mitgeteilten Experimenten zu haben, da alle geprüften Komponenten an und für sich immer noch einen gewissen, wenn auch in einigen Fällen nur minimalen Nährwert hatten, denn Leerversuche mit Zuckerlösung und Hefezellen in der angegebenen Verdünnung gaben gar keine Kohlensäureentwicklung. Aufgabe weiterer Versuche wird es nun sein, das Hefeautolysat in weitere Fraktionen aufzuteilen, und erst wenn wir eine solche finden, die mit Zucker und wenig Hefezellen keine Gärung ergibt, dagegen in einem normal zusammengesetzten Nährmedium die Kohlensäure- und Hefebildung zu beschleunigen vermag, werden wir von einer neuen Wirkung, wie Vitaminwirkung sprechen dürfen.

Bericht über die Jahresversammlung des Schweizerischen Vereins analytischer Chemiker.

18. und 19. Juni 1920 in Interlaken.

Teilnehmerliste.

Herr E. Ackermann, Genf	Herr J. Pritzker, Basel
» G. Ambühl, St. Gallen	» E. Rieter, Zürich
» O. Bänninger, Bern	» E. Rüttimann, Biel
» W. J. Baragiola, Zürich	» F. Schaffer, Bern
» H. Becker, Glarus	» C. Schenk, Interlaken
» A. Bertschinger, Zürich	» A. Schmid, Frauenfeld
» A. Besson, Winterthur	» B. Schmitz, Zürich
» A. Burdel, Fribourg	» E. Schumacher, Luzern
» J. Bürgi, Brunnen	» K. Siegfried, Zofingen
» R. Burri, Bern	» P. Sjöstedt, Serrières
» A. Evéquo, Fribourg	» W. Steck, Bern
» Th. v. Fellenberg, Bern	» J. Thomann, Bern
» L. Geret, Lenzburg	» W. Thomann, Zürich
» Ch. Godet, Auvernier	» J. Thöni, Fribourg
» E. Holzmann, Winterthur	» L. Tschumi, Lausanne
» P. Huber, Bern	» E. Vautier, Bern
» R. Jenzer, Interlaken	» A. Verda, Lugano
» J. Jeanprêtre, Neuchâtel	» J. Walter, Solothurn
» G. Kœstler, Bern	» F. v. Weber, Bern
» P. Liechti, Bern	» J. Werder, Aarau
» G. Nussberger, Chur	» A. Widmer, Wädenswil
» U. Pfenninger, Zürich	» G. Wiegner, Zürich
» E. Philippe, Zürich	» B. Zurbriggen, Sitten.