Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 58 (1948)

Artikel: Beitrag zur Kenntnis der Tabakfermentation

Autor: Grob, Kurt

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-41309

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. 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. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

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. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

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. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.10.2025

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

Beitrag zur Kenntnis der Tabakfermentation

Von *Kurt Grob,* dipl. rer. nat.

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich

Eingegangen am 20. Februar 1948

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	172
2. Methodisches	174
a) Anforderungen und Möglichkeiten	174
b) Das Versuchsmaterial	175
c) Die Meßapparatur	175
d) Manometrische Atmungsmessung bei wählbarem Wassergehalt des atmenden Materials	177
e) Beurteilung und Auswertung der Meßresultate	181
f) Messung bei Anwesenheit von Blausäure	182
g) Wärmevorbehandlung	183
3. Der Anteil der Mikroorganismen am Fermentationsvorgang	183
a) Experimentelle Unterscheidung von mikrobiologischer und enzymatischer Gärung	183
b) Die Bedeutung der mikrobiellen Gärung für die praktische Fermentation	186
4. Der Einfluß der Wärmevorbehandlung auf die Gärfähigkeit des Tabaks	188
a) Bisherige Anschauungen	188
b) Die Gärfähigkeit des Tabaks nach Wärmevorbehandlung	189
c) Untersuchung des nichtenzymatischen Gärvorganges	193
d) Die Ursache der nichtenzymatischen Oxydierbarkeit der Glukose	196
e) Die Bedeutung der nichtenzymatischen Gärung für die praktische Fermentation	198
5. Zusammenfassung	200
Literaturverzeichnis	201

1. Einleitung und Problemstellung

Unter « Tabakfermentation » versteht man in der Industrie den Vorgang, der das getrocknete Tabakblatt unter Wärmeentwicklung in das eigentliche Rohmaterial für die Herstellung von Rauchwaren verwandelt. Seine wichtigsten Kennzeichen sind: Entwicklung des Aromas, Eliminierung geschmacklich unerwünschter Bestandteile, endgültige Fixierung der Farbe und Erhöhung der Lagerfähigkeit.

Den gesamten Literaturnachweis über die chemischen, physiologischen und physikalischen Vorgänge bei der Tabakaufbereitung findet man bei Bodnar und Barta (1) und bei Frankenburg (2).

Frey-Wyßling (3) hat in neuerer Zeit die Anschauungen über die Natur der Tabakfermentation dargestellt, die sich auf Grund der bisherigen Arbeiten und Erkenntnisse gewinnen lassen. Er kommt dabei zu folgendem Schluß:

Die Tabakfermentation ist in erster Linie ein *autolytischer* Prozeß. Die Autolyse kann in den späteren Phasen ihres Ablaufes von einer mikrobiologischen Gärung begleitet werden, die jedoch für den Gesamtvorgang von sehr untergeordneter Bedeutung ist.

Die beiden wichtigsten theoretischen Überlegungen, die Frey-Wyßling zu diesem Schlusse führen, sind die folgenden:

1. Die bei der Fermentation herrschenden Reaktionsbedingungen (18—25 % Wassergehalt der Blätter, 40—60° C) verunmöglichen eine wesentliche Entfaltung der Tätigkeit von Mikroorganismen oder benachteiligen sie zum mindesten stark gegenüber der Tätigkeit der blatteigenen Fermentsysteme.
2. Auch im Falle eines gleichzeitigen Ablaufes einer mikrobiologischen Gärung mit der Autolyse ist den Blattfermenten die größere Wirksamkeit beizumessen, da sie den Abbau der vergärbaren Substrate unmittelbar an Ort und Stelle durchführen können, während Mikroorganismen höchstens mittelbar einwirken.

Die Autolysenvorgänge bei der Tabakfermentation sind besonders von Smirnow und seiner Schule (zahlreiche russische Arbeiten, uns nur in Form von Referaten zugänglich) gründlich untersucht worden. Daneben wird aber noch in neuerer Zeit auch die Theorie der Mikrobengärung intensiv verfochten, besonders von Giovannozzi (4).

Auf Grund der experimentellen Arbeiten kann die Existenz beider Gärvorgänge als erwiesen betrachtet werden. Unbekannt ist dagegen, wie sich die Gesamtheit der bei der Fermentation eintretenden Veränderungen ihrer Ursache nach auf die beiden Einflüsse verteilt.

Angesichts dieser Sachlage stellten wir uns als *erste Aufgabe* die Bestimmung des Anteiles der beiden in Frage kommenden Gärvorgänge am gesamten Fermentationsvorgang unter verschiedenen äußeren Bedingungen.

Eine *zweite Aufgabe* ergab sich aus Beobachtungen in der Technik: In Europa nimmt die künstliche Trocknung der geernteten Tabakblätter immer größeren Umfang an. Die Trocknungstemperaturen übersteigen dabei nicht selten 90° C, Temperaturen, die kaum ohne wesentlichen Einfluß auf den Fermentkörper der Blätter bleiben können. Ähnliche Wärmegrade werden in der Redry-Maschine erreicht. Man fragt sich sofort, wie die Fermentation des so vorbehandelten Materials verlaufen werde. Tatsächlich unterscheidet sich indessen dieser Fermentationsvorgang äußerlich kaum von demjenigen der natürlich getrockneten Blätter, die nie Temperaturen über 30° ausgesetzt waren.

Aus diesen eigenartigen Feststellungen ergab sich als zweite Aufgabe die Untersuchung des Einflusses der Wärmevorbehandlung auf den Fermentationsvorgang.

Die Arbeit ist am Pflanzenphysiologischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Frey-Wyßling ausgeführt worden.

2. Methodisches

a) Anforderungen und Möglichkeiten

Die wissenschaftliche Erforschung setzt notwendigerweise eine quantitative Erfassung des Fermentationsvorganges voraus. Da es sich um einen sehr komplexen Prozeß handelt, müßten wir also die Intensitäten aller Teilvorgänge bei bestimmten äußeren Bedingungen messen. Wir kennen aber die Mehrzahl dieser Teilvorgänge nicht oder sehr wenig genau, und noch viel weniger sind wir in der Lage, ihre Intensitäten zu messen. Es kann sich also bei unseren Experimenten auf jeden Fall nur um einen mehr oder weniger zweckmäßigen Notbehelf handeln.

Die Teilreaktionen, die zusammen den Fermentationsprozeß ausmachen, lassen sich nach Frey-Wyßling (3) zwei Hauptgruppen zuordnen:

1. desmolytische (oxydative) Reaktionen,
2. hydrolytische Reaktionen.

Während die Hydrolyse ohne wesentliche Wärmetönung verläuft und darum einzig auf Grund des Verschwindens ihrer Substrate zu verfolgen ist, verlaufen die desmolytischen Reaktionen stark exotherm und sind darum durch Temperaturmessungen direkt kontrollierbar. Sie liefern darüber hinaus durch die Erwärmung und die Bildung von Oxydationswasser stark verbesserte Bedingungen für die Hydrolyse. Die Intensität des Oxydationsvorganges wird darum schon seit langem als das zweckmäßigste Maß für den gesamten Fermentationsvorgang benützt.

Leider erweist sich die Handhabung der Wärmemessung als schwierig. Johnson (5) hat solche Messungen ausgeführt. Er schloß Proben von 300 g Tabak in Dewar-Gefäße ein, um die Wärmeabstrahlung so weit als möglich zu verhindern. Zudem stellte er die Gefäße zur Herabsetzung des Temperaturgefälles in Thermostaten auf. Trotzdem vermochte er auf diese Weise nur bei Blattfeuchtigkeiten über 30% sicher Temperatursteigerungen nachzuweisen, im günstigsten Fall solche von 6 Graden. Die Resultate waren zudem nicht genügend reproduzierbar, so daß feinere Untersuchungen ausgeschlossen waren.

An Stelle der gelieferten Wärme kann der verbrauchte Sauerstoff als Maß für den Oxydationsvorgang dienen. Es ist zwar nicht zu erwarten, daß sich die beiden Maße durch geeignete Wahl der Einheiten identifizieren lassen, denn ein Volumen Sauerstoff liefert bei seiner Um-

setzung mit verschiedenen Stoffen verschiedene Wärmemengen. Es läßt sich indessen zeigen, daß erst tiefgreifende Veränderungen der Gärsubstrate die relative Vergleichbarkeit der beiden Maßstäbe in einer Weise herabsetzen, daß aus Messungen nach den beiden Methoden verschiedene Schlüsse gezogen werden müssen.

Führt man die Bestimmung des Sauerstoffverbrauches manometrisch nach der Warburgschen Methode durch, so erhält man bei Anwendung der mehr als tausendmal geringeren Materialmenge (200 mg) eine zehnmal höhere Meßgenauigkeit als bei der Wärmemessung. Diese Methode wurde schon 1926 von Fodor und Reifenberg (6) und später von Smirnow angewandt. Ihre Resultate konnten aber nicht direkt mit der praktischen Fermentation verglichen werden, da sie, wie es bei der Warburg-Methode üblich ist, das Blattmaterial in Wasser aufschlämmten. Damit ging der wichtigste Versuchsfaktor, der Wassergehalt der Blätter, als Variable verloren, indem immer Wassersättigung herrschte.

Um die Warburg-Methode für unsere Zwecke verwenden zu können, mußten wir die Möglichkeit schaffen, den Wassergehalt des Tabaks zu variieren.

b) Das Versuchsmaterial

Wir verwendeten fast ausnahmslos in unserer Pflanzung in Zürich gezogenen Tabak der Varietät Mont Calme jaune. Die je nach dem Zweck der Messungen natürlich oder künstlich getrockneten Blätter wurden zerkleinert und die Hauptrippen und ersten Seitennerven entfernt. Aus dem aus Blattstücken verschiedener Größe bestehenden Gemenge wurde mittels zweier Siebe von 0,6 und 1,2 mm Porenweite eine Fraktion von zirka 1 mm^2 Blattfläche gewonnen.

Die ideale Aufbewahrung dieses Materials ist ein noch ungelöstes Problem, indem der Wassergehalt zur Vermeidung der Autolyse unter 10 % gehalten werden muß, wobei aber bereits eine bleibende Schädigung der Enzymaktivität eintritt, wahrscheinlich durch zu starke Störung des kolloiden Zustandes der Enzyme. Es gelang durch keine Art der Lagerung (kalt, trocken, dunkel, in Stickstoffatmosphäre), das Material so zu erhalten, daß Messungen, die mit einer Woche zeitlichem Abstand ausgeführt wurden, direkt miteinander verglichen werden konnten. Messungen, bei denen kleine Unterschiede bedeutsam waren, mußten stets am gleichen Tage ausgeführt werden.

c) Die Meßapparatur

Wir verwendeten die gebräuchlichen Barcroft-Manometer (Typus mit konstantem Volumen). Alle notwendigen Angaben über Anwendungsmöglichkeiten, Behandlung, Eichung, Berechnung der Resultate findet man in dem Buch von Dixon (7). Unsere Meßgefäße hatten die

Form von Erlenmeyer-Kolben mit einer Höhe von 2,5 cm bis zum Schliffansatz. Der Durchmesser der Bodenfläche betrug 4 cm, das Volumen 18 cm^3. Wir wählten diese Gefäßform, da wir eine große Bodenfläche bei kleinstmöglichem Volumen benötigten. Die Gefäße trugen einen seitlichen Ventilansatz, der die Erneuerung der Luft im Gasraum ohne Unterbrechung der Messung erlaubte.

Die Gefäße tauchten in ein Thermostatenbad von 200 Liter Wasser von 40° C. Diese Meßtemperatur stellt bei tagelangen Versuchen erhebliche Anforderungen an die Dichtheit der Schliffe. Werden diese stark gefettet, so besteht die Gefahr, daß sie sich unter Verdrängung des Fettes langsam verschieben, so daß sich das Volumen verändert und die Messungen auf unkontrollierbare Weise verfälscht werden. Bei zu schwacher Fettung sitzen die Schliffe nach längerem Gebrauch fest. Man benötigt ein Hahnfett, das mit steigender Temperatur seine Viskosität wenig ändert. Paraffin- und wachshaltige Gemische waren dafür ganz ungeeignet. Ungeeignet war ferner das für diesen Zweck oft empfohlene Adeps lanae, da es sich bei dieser Temperatur mit Wasser emulgiert, so daß die Schliffe Wasser durchtreten lassen. Bewährt hat sich eine Lösung von 2 Gewichtsteilen Rohkautschuk in 5 Teilen Vaseline. Die Lösung wurde durch einstündiges Erhitzen des Gemisches auf 180 bis 200° unter ständigem Rühren hergestellt.

Die Temperaturkonstanz des Thermostaten betrug $\pm$ 0,003°. Diese Genauigkeit wurde erreicht erstens durch Zweiteilung der Heizung: Ein erstes Heizelement wurde über einen Regulierwiderstand so eingestellt, daß es allein das Bad auf 36—38° erhalten konnte, während ein zweites mit vierfacher Heizleistung mit Hilfe eines sehr empfindlichen Toluol-Quecksilberregulators die Temperatur auf 40° konstant hielt. Ebenso wichtig war zweitens das Rührsystem: über dem Bad lagerte mit horizontaler Achse eine Walze von gleicher Länge wie das Bad. Ihre Flügel tauchten zirka 2 cm ins Wasser und erteilten der ganzen Wassermasse eine walzenförmige Zirkulationsbewegung von umgekehrtem Drehsinn. Der Vorteil dieser Umwälzung liegt in der Gleichmäßigkeit der Strömung. Wir erreichten mit propellerartigen Flügeln mit senkrecht stehender Achse auch bei viel höheren Tourenzahlen und Motorenleistungen nicht annähernd die gleiche Temperaturkonstanz, da die Bildung von Wirbelzonen auch bei kräftigster Rührung die gleichmäßige Durchmischung verhindert.

Für die gewöhnlichen manometrischen Messungen ist eine solche Temperaturkonstanz nicht erforderlich, da Schwankungen von 0,1° noch leicht mit Hilfe des Thermobarometers korrigiert werden können. Sie ist dagegen unbedingte Voraussetzung, wenn man mit trockenem Blattmaterial arbeitet. Trockene Blätter adsorbieren, wie Willstaetter und Stoll (8) feststellten, erhebliche Gasmengen. Eine Temperatursteigerung von 0,01° setzt von diesen adsorbierten Gasen soviel in Frei-

heit, daß die entsprechende Drucksteigerung die Messung empfindlich stört. Eine Korrektur für diese Fehler analog dem Thermobarometer-System ist nicht möglich.

d) Manometrische Atmungsmessung bei wählbarem Wassergehalt des atmenden Materials

Wie schon erwähnt, ist es bei Atmungsmessungen üblich, das atmende Material in Wasser aufzuschlämmen. Die schwer übersehbaren Adsorptionsvorgänge an der Gewebeoberfläche sind dann weitgehend ausgeschaltet, indem keine direkte Berührung zwischen Gewebe und Luft mehr besteht. Das Wasser transportiert dann den Sauerstoff an die Stellen der Oxydation und führt die Kohlensäure weg.

Voraussetzung bei den Messungen ist, daß das Wasser stets sauerstoffgesättigt ist, was durch Schütteln der Gefäße erreicht wird. Verbraucht der Atmungsvorgang mehr Sauerstoff, als während der gleichen Zeit durch Lösung aus dem Luftraum des Gefäßes aufgenommen werden kann, so wird die Sättigung unterschritten. Dies ist sofort daran zu erkennen, daß die Atmungsgeschwindigkeit von der Schüttelfrequenz abhängig wird. Die Auflösung des Sauerstoffs in Wasser muß dann solange durch schnelleres Schütteln gefördert werden, bis die gleichzeitig beobachtete Atmungsgeschwindigkeit nicht weiter ansteigt. Bei Messungen bei 20—25° wird dieser Umstand meist nicht beachtet, da die Sauerstoffsättigung schon mit niedrigen Schüttelfrequenzen erreicht wird. Bei 40° ist er dagegen von großer Bedeutung, da bei dieser Temperatur die Atmungsgeschwindigkeit im allgemeinen höher, die Löslichkeit des Sauerstoffs in Wasser aber niedriger ist. Man muß daher für jede Gefäßform, für jedes Atmungsmaterial, ferner für jedes Verhältnis Materialmenge/Wassermenge die minimale Schüttelfrequenz bestimmen. Andernfalls werden die Messungen völlig unzuverlässig.

Da sich für uns die Aufgabe stellte, den Wassergehalt des Atmungsmaterials variabel zu machen, kam Wasser als Aufschlämmungsmittel nicht in Frage. Wir versuchten es zuerst durch eine physiologisch indifferente, hydrophobe Flüssigkeit zu ersetzen. Paraffinöl zum Beispiel besitzt eine so geringe Mischbarkeit mit Wasser, daß darin aufbewahrtes Blattmaterial tagelang seinen Anfangswassergehalt sehr genau behält. Versuche mit besonders niedrig-viskosem Paraffinöl scheiterten aber an der Unmöglichkeit, das Gebiet der Sauerstoffsättigung zu erreichen, wegen der schlechten Löslichkeit des Sauerstoffs und der schlechten Durchmischung infolge der hohen Viskosität.

Günstiger werden diese Verhältnisse bei Verwendung einer niedriger molekularen, tiefersiedenden Flüssigkeit. Dafür ist dann meist die Bedingung der physiologischen Indifferenz nicht mehr erfüllt. Die besten Resultate erhielten wir mit *Dekalin* (Dekahydronaphthalin) bei folgender Arbeitsweise:

Die Blattstücke (200 mg) wurden lufttrocken mit bekanntem Wassergehalt (8—12 %) eingewogen. War zum Beispiel bei einem Anfangsgehalt von 10 % eine Untersuchung bei 30 % Wasser vorgesehen, so mußten zur Einwaage von 200 mg noch 36 mg Wasser (der Wassergehalt wird auf Trockensubstanz berechnet!) hinzugefügt werden. Da die Dosierung so kleiner Mengen und noch mehr ihre gleichmäßige Verteilung sehr schwierig ist, gingen wir folgendermaßen vor:

Dekalin läßt sich nach Zusatz von 0,1 % Lanolin mit kleinen Wassermengen emulgieren. Wir stellten solche Emulsionen her von abgestuftem, sehr genau eingestelltem Wassergehalt. Wurden in unserem Beispiel 4 cm^3 Aufschlämmungsflüssigkeit und 36 mg Wasser benötigt, so mußten zur Einwaage 3,6 cm^3 einer einprozentigen Emulsion und 0,4 cm^3 reines Dekalin zugesetzt werden. Nach kurzem Schütteln hatten die Blattstücke der Emulsion das Wasser vollständig entnommen. Genaue Dosierung und gleichmäßige Verteilung wurden so bei einfachster Arbeitsweise gleichzeitig erreicht. Ebenso vorteilhaft ist ferner die Schnelligkeit, mit der der Wassergehalt eingestellt wird (zirka 1 Minute), da bei langsamer Befeuchtung immer mit einem unkontrollierbaren vorzeitigen Einsetzen der Autolyse gerechnet werden muß.

Trotz dieser Vorzüge haben wir die Methode nach ihrer Ausarbeitung wieder verlassen, aus zwei Gründen:

Die natürlichen Entwicklungsbedingungen für Mikroorganismen werden von dieser Methode sehr schlecht nachgeahmt. Sie ist geeignet zur Verfolgung rein enzymatischer Prozesse, wobei die Mikrobenentwicklung durch Zusatz eines Antiseptikums (Chloroform, Toluol) ausgeschaltet wird.

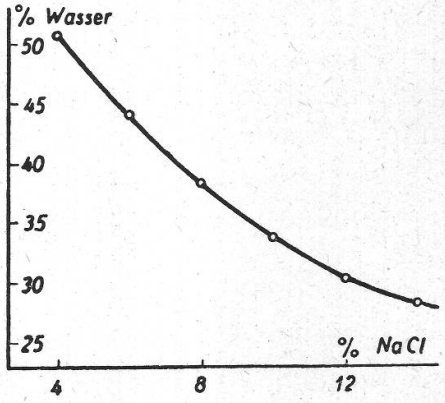
Als zweiter Hinderungsgrund fiel für uns ins Gewicht, daß zur Erreichung der Sauerstoffsättigung immer noch eine Schüttelgeschwindigkeit von 250—300 Touren pro Minute nötig war. Bei mehrtägigen ununterbrochenen Versuchen bedeutet dies eine große apparative Schwierigkeit.

Wir haben darum die *Aufschlämmungsflüssigkeit* ganz *weggelassen* und die Feuchtigkeitsregulierung des locker aufgeschichteten Blattmaterials mit Hilfe geeigneter Konzentrationen der Einsatzlösungen bewerkstelligt. An Stelle der 0,1-n-Natronlauge, die sonst gewöhnlich zur Absorption der Kohlensäure in den Rohrstutzen im Gefäßboden eingefüllt wird, verwendeten wir entsprechend konzentriertere Laugen. Durch Überdestillieren von Wasser aus der Lauge zum Tabak oder umgekehrt stellte sich ein von der Laugenkonzentration abhängiger Wassergehalt der Blattstücke ein.

Anfänglich waren trotz ausgezeichneter Temperaturkonstanz des Thermostaten keine brauchbaren Messungen möglich. Als Ursache fanden wir, daß der bei der Hydrolyse der Pektinstoffe gebildete Methyl-

alkohol mit seinem bei 40° schon hohen Dampfdruck die manometrische Messung unbrauchbar machte.

Wir konnten diese Störung auf folgende Weise vermeiden: Methylalkohol wird durch alkalische Permanganatlösung absorbiert. Damit die Absorption genügend rasch und vollständig erfolgt, muß die Konzentration der Oxydationslösung ziemlich hoch sein. Wird sie aber zu hoch angesetzt, so liefert die Lösung spontan Sauerstoff, der wiederum die Druckmessung stört. Wir haben darum die einmal als geeignet befundenen Konzentrationen an Natronlauge und Kaliumpermanganat konstant gehalten und zur Einstellung des gewünschten Wasserdampfdruckes wechselnde Mengen Kochsalz zugesetzt. Am besten bewährte sich eine Lösung mit 2 % Kaliumpermanganat, 6 % Natronlauge und



Figur 1
Wassergehalt des Tabaks über alkalischen $KMnO_4$-Lösungen von verschiedenem NaCl-Gehalt

4—16 % Kochsalz. Der Wassergehalt, der sich im Tabak im Gleichgewichtszustand über solchen Lösungen einstellte, geht aus der graphischen Darstellung Figur 1 hervor. Die Konzentrationsangaben bedeuten die Kochsalzkonzentrationen in der alkalischen Permanganatlösung. Die Einsatzlösung erfüllte also gleichzeitig drei Aufgaben: 1. Absorption der Atmungskohlensäure, 2. Absorption des Methylalkohols, 3. Regulierung des Wasserdampfdruckes. In die Lösung wurde ein Glasstab gestellt, der beim Schütteln der Gefäße den Inhalt der Einsätze aufwirbelte und so die Bildung einer isolierenden Braunsteinhaut auf der Flüssigkeitsoberfläche verhinderte.

Praktisch gingen wir so vor, daß der Tabak vor der Einwaage auf irgendeine Weise ungefähr auf den gewünschten Wassergehalt gebracht wurde; erstens, damit die Einstellung des Gleichgewichtes im verschlossenen Gefäß nicht mehr viel Zeit erforderte, und zweitens, damit die Einsatzlösungen durch Wasserverlust oder Wasseraufnahme ihre Konzentration möglichst wenig änderten. Diese vorgängige Befeuchtung war möglich durch direkten, volumenmäßig dosierten Wasserzusatz oder durch Aufbewahrung von bestimmter Dauer in einer feuchten Kammer. In jedem Falle mußte darauf das fertig eingefüllte Gefäß verschlossen noch 10—15 Stunden bei zirka + 5° verweilen, damit der Gleichgewichts-

zustand sicher erreicht wurde, ohne daß die Autolyse merklich einsetzen konnte. Das Gleichgewicht ist selber nicht temperaturabhängig, dagegen natürlich die Geschwindigkeit seiner Einstellung. Vor Beendigung dieses Ausgleichs sind manometrische Messungen unmöglich, da der Wasserübergang in der einen oder andern Richtung von starken Druckänderungen begleitet wird, offenbar, weil mit der Änderung des Wassergehaltes auch die Adsorptionsfähigkeit des Gewebes für Gase sich ändert.

Die genaue Lage des Gleichgewichtes hängt vom Material ab. Die angeführte Kurve ist ein einzelnes Beispiel und hat für Versuche mit anderem Material nur orientierenden Wert. Der genaue Wassergehalt muß darum für jede einzelne Probe nach der Messung bestimmt werden, jedenfalls, wenn man ihn mit größerer Genauigkeit als ± 2 % kennen will. Während der Messung darf man ihn solange als konstant annehmen, als nicht sehr starke Gärvorgänge längere Zeit anhalten. Trifft das letztere zu, so steigt er stark an, da mit fortschreitender Hydrolyse in zunehmendem Maße vorher unlösliche oder kolloidgelöste Stoffe in Lösung übergehen, wobei der osmotische Wert dieser Lösung steigt und ihr Wasserdampfdruck sinkt. Im Gegensatz zur Wärmemessung, die erst bei starken Gärungen brauchbare Resultate liefert, ist diese Methode bei stürmischen Gärverläufen gar nicht oder nur während der ersten Stunden verwendbar.

Unsere anfängliche Befürchtung, die Diffusion der Atmungskohlensäure aus dem locker geschichteten Material zum Laugeeinsatz könnte ungenügend sein, erwies sich als unbegründet.

Wir haben die Meßmethode mit wässeriger Aufschlämmung mit unseren soeben beschriebenen Methoden mit variablem Wassergehalt verglichen und gefunden, daß die erstere zur Verfolgung mikrobieller Gärvorgänge ganz unbrauchbar ist, zum mindesten dann, wenn die Resultate Rückschlüsse auf die natürlichen Verhältnisse liefern sollten. Schaltet man aber die Mikrobenentwicklung aus, indem man als Aufschlämmungsmittel mit Chloroform gesättigtes Wasser verwendet (das Chloroform verursacht in dieser Konzentration keine meßbare Enzymhemmung!), so erhält man für den rein autolytischen Vorgang dieselben Resultate wie ohne Aufschlämmungsmittel, nur mit 20- bis 50facher Beschleunigung. Nachdem diese Tatsache gesichert war, haben wir auch diese Methode öfters verwendet, wenn die Mikrobentätigkeit nicht interessierte.

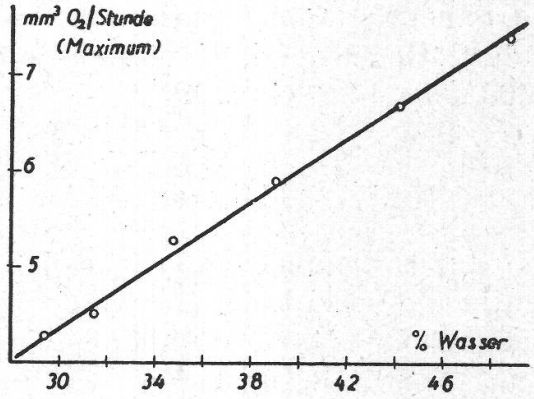
Während wir in der Regel lediglich die Sauerstoffaufnahme pro Zeiteinheit als Maß für die Gärgeschwindigkeit bestimmten, haben wir in einzelnen Fällen auch die *Kohlensäure*abgabe gemessen. Dies war nur bei wässeriger Aufschlämmung möglich, da wir über die Adsorption der Kohlensäure an der Gewebeoberfläche bei veränderlichem Wassergehalt zu wenig unterrichtet sind. Die Messungen wurden in der gewohnten Weise mit Hilfe von Parallelversuchen mit und ohne Laugeeinsatz durch-

geführt, unter Berücksichtigung der im Aufschlämmungswasser gelösten Kohlensäure.

e) Beurteilung und Auswertung der Meßresultate

Wir hofften, mit unserer Methode mit höherer Meßgenauigkeit und reicheren Experimentiermöglichkeiten prinzipiell die gleichen Resultate zu erhalten wie mit der Wärmemessung. Wir fanden später bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Gärgeschwindigkeit und Blattfeuchtigkeit diese Hoffnung weitgehend erfüllt:

Wolgunow (9) und unabhängig von ihm Jensen (10) fanden mit Hilfe der Wärmemessung, daß die Gärgeschwindigkeit direkt proportional der Blattfeuchtigkeit ansteige. Wir haben manometrisch ohne Aufschlämmung das in Figur 2 veranschaulichte Resultat erhalten, also eine sehr schöne Bestätigung der Proportionalität. Wir entnehmen



Figur 2
Zusammenhang zwischen Gärgeschwindigkeit und Blattfeuchtigkeit

daraus, daß das Maß: Sauerstoffaufnahme pro Zeiteinheit, mit einiger Berechtigung als Maß für die Gärgeschwindigkeit dienen kann (wir benützen den Begriff « Gärung » entsprechend dem Gebrauch in der Praxis allgemein für den wärmeliefernden Vorgang, ohne damit über die Natur dieses Vorganges etwas auszusagen!).

Bei allen unseren Messungen war eine Bedingung nicht erfüllt, die sonst für reproduzierbare, manometrische Stoffwechselmessungen Voraussetzung ist: Alle verfolgten Gärvorgänge zeigten stark veränderliche Geschwindigkeiten. Um dennoch vergleichbare Resultate zu bekommen, muß man die äußeren Bedingungen, denen die Ansätze vor Beginn der Messung ausgesetzt sind, sehr genau konstant halten. Dies gilt vor allem für die Zeitspanne vom Eintauchen der Gefäße ins Thermostatenbad bis zum Schließen der Manometer. Diese « Anlaufzeit » betrug bei Trockenmessungen 2 Stunden, bei Messungen in Aufschlämmung 30 Minuten. In ähnlicher Weise empfiehlt es sich auch, die Zeit vom Einfüllen bis zum Eintauchen konstant zu halten, ferner die Temperatur der Umgebung. Läßt man diese Umstände unberücksichtigt, so fehlt den Messungen der zeitliche Nullpunkt. Damit verlieren sie ihre Vergleichbarkeit.

Die Resultate wurden folgendermaßen ausgewertet:

Wir bestimmten die Sauerstoffaufnahme während eines Zeitintervalls, dessen Größe von der Geschwindigkeit und der Geschwindigkeitsänderung des Gärvorganges abhing. Das Intervall mußte so groß sein, daß sich am Manometer ein sicher meßbarer Ausschlag ergab, mußte aber so klein gewählt werden, daß sich innerhalb der betreffenden Zeit die Gärgeschwindigkeit nur linear veränderte. Das verschwundene Sauerstoffvolumen dividiert durch die Länge des Intervalls, gemessen in Stunden, ergab die mittlere Gärgeschwindigkeit, die über dem Mittelpunkt des Intervalls aufgetragen wurde. (Bei nichtlinearen Geschwindigkeitsänderungen wird die mittlere Geschwindigkeit nicht in der Mitte des Intervalls erreicht.) Auf diese Weise konnten bei tagelang andauernden Messungen zu beliebigen Zeiten Kurvenpunkte aufgenommen werden, während in der Zwischenzeit die Manometer offenbleiben konnten. Voraussetzung für die Richtigkeit dieses Vorgehens ist einzig, daß sich die Sauerstoffkonzentration im Luftraum der Gefäße nicht wesentlich ändert. Gegebenenfalls wird es nötig, von Zeit zu Zeit frische atmosphärische Luft einzufüllen.

f) Messung bei Anwesenheit von Blausäure

Zur Erkennung von enzymatischen Oxydationsvorgängen haben wir häufig die spezifische Hemmung mit Blausäure verwendet. Mit unserer Meßmethode ohne Aufschlämmung gelang es nicht, bei Anwesenheit von Blausäure zu brauchbaren Resultaten zu kommen. Das Blattmaterial direkt mit Kaliumcyanidlösung zu tränken, war wegen der stark alkalischen Reaktion des Salzes nicht erlaubt. Freie Blausäure konnte ebenfalls nicht verwendet werden, da sie sehr rasch durch die Einsatzlösung absorbiert wurde.

Wir versetzten das Aufschlämmungswasser pro cm^3 mit 0,1 cm^3 einer 0,1prozentigen Blausäurelösung: In 50 g Lösung 150 mg Kaliumcyanid und 110 mg konzentrierte Schwefelsäure. Das Blattmaterial befand sich also bei Versuchsbeginn in einer Lösung mit 0,01 % Blausäure. Auch unter diesen Umständen sank die Blausäurekonzentration stets rasch. Da die Hemmung der Enzyme reversibel ist, mußten die Messungen in allen Fällen innerhalb der ersten zwei Stunden nach dem Ansetzen der Proben beendigt werden.

Die Blausäurelösung ist nicht haltbar und muß am Tage ihrer Verwendung frisch hergestellt werden.

Die blausäurehaltige Aufschlämmungslösung verbraucht selbst Sauerstoff! Die verbrauchte Menge muß stets im parallelen Blindversuch festgestellt und entsprechend berücksichtigt werden.

g) Wärmevorbehandlung

In der Technik findet eine Wärmevorbehandlung des Tabaks bei der künstlichen Trocknung und in der ersten Phase des Redry-Prozesses statt. Das Tabakblatt wird dabei langsam ansteigenden Temperaturen ausgesetzt, während sein Wassergehalt sinkt. Es bestehen also in doppeltem Sinne inkonstante Versuchsbedingungen.

Es ist dabei unmöglich, zu erfahren, wann und mit welchem Wassergehalt das Blatt eine bestimmte Temperatur erreicht, oder ob es sie überhaupt erreicht. Denn solange noch größere Wassermengen vorhanden sind, hält die Verdunstungskälte das Blatt bedeutend kühler als seine Umgebung. Bei zunehmender Austrocknung sinkt darauf die Wärmeleitfähigkeit des Blattes so stark, daß das Gewebe die Temperatur seiner Umgebung nur sehr langsam annimmt. Das Ausmaß der Wärmeeinwirkung ist also sehr schwer abzuklären.

Für systematische Versuche müssen sowohl Temperatur als Wassergehalt beliebig wählbar sein und darauf beliebig lange konstant gehalten werden können. Dies ist einwandfrei nur möglich, wenn die Proben vor der Wärmebehandlung in Ampullen eingeschmolzen werden. Darauf können sie mit konstantem Wassergehalt einer konstanten Temperatur ausgesetzt werden.

Durch Evakuierung der Ampullen oder Füllung mit Stickstoff erreicht man ferner, daß während der Erhitzung keine Oxydation einsetzen kann, so daß eine bloße Vorbehandlung stattfindet, deren Einfluß auf die Fermentation man darauf bei einer andern Temperatur und einem andern Wassergehalt untersuchen kann.

3. Der Anteil der Mikroorganismen am Fermentationsvorgang

a) Experimentelle Unterscheidung von mikrobiologischer und enzymatischer Gärung

Wie auf S. 180 ausgeführt wird, erlaubt die manometrische Messung der Sauerstoffaufnahme bei wässeriger Aufschlämmung nur die Verfolgung der enzymatischen Gärung, da die Entwicklung der Mikroorganismen unter diesen Umständen sich so rasch vollzieht, daß sie von Anfang an durch Zusatz von Antiseptika ausgeschaltet werden muß.

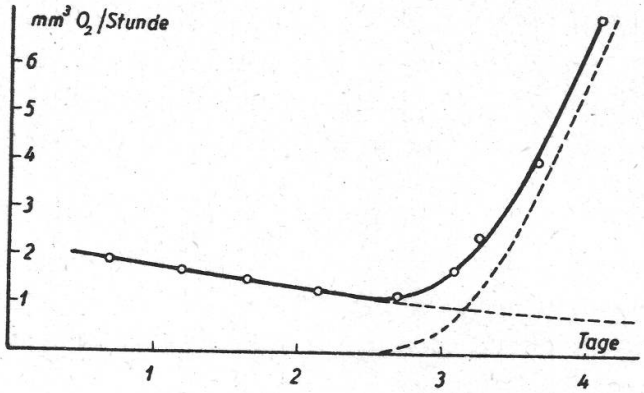
Die Versuchsbedingungen bei der Wärmemessung sind wohl den natürlichen am ähnlichsten, doch war Johnson (5) nicht imstande, auf Grund der nach zehn Tagen konstatierten Erwärmung Rückschlüsse auf die Natur der Gärung zu ziehen.

Der Vergleich der Keimzahlen des fermentierten gegenüber dem Ausgangsmaterial erlaubt wohl, eine Vermehrung und damit eine Tätigkeit der Mikroorganismen festzustellen. Ob aber diese Tätigkeit gegenüber derjenigen der Blattenzyme ins Gewicht fällt, kann so nicht abgeklärt werden.

Mit Hilfe unserer Methode der manometrischen Messung bei konstantem, den natürlichen Verhältnissen entsprechendem Wassergehalt der Blätter war die Unterscheidung der beiden Gärursachen ohne weiteres möglich, indem sie sich direkt aus dem Verlauf der Gärung ergab.

Figur 3 stellt die typische, immer wieder zu erhaltende Gärkurve eines natürlich getrockneten, in keiner Weise vorbehandelten Materials bei 30—40 % Wassergehalt dar. Charakteristisch ist das Einsetzen mit einem maximalen Wert, das langsame Absinken und darauf der starke Anstieg, für dessen weitere Verfolgung unsere Methode sich nicht eignet, weil im Verlaufe der nun stark einsetzenden Hydrolyse das Dampfdruckgleichgewicht im Meßgefäß gestört wird.

Der noch sicher aufnehmbare Kurventeil ist indessen aufschlußreich genug. Schon seine Form läßt vermuten, daß er die Summe zweier Einzelkurven darstellt, die punktiert eingezeichnet sind. Davon stellt die



Figur 3
Ausgezogene Kurve: normaler Gärverlauf bei 35 % Wassergehalt

absteigende Kurve den autolytischen [1], die ansteigende den mikrobiellen Gärvorgang dar. Daß die Autolyse bei konstanten äußeren Bedingungen mit ihrer maximalen Geschwindigkeit einsetzt, erklärt sich durch die Überlegung, daß Substratkonzentration wie auch Enzymaktivität am Anfang am höchsten sind und im Verlaufe der Gärung abnehmen.

Daß die Substratkonzentration infolge des Abbaues sinkt, versteht sich von selbst. Aber auch die Aktivität der Enzyme sinkt, wie wir feststellen konnten, bei normaler Fermentation auf 4—8 % der Anfangsaktivität. Diesem Umstand ist es zuzuschreiben, daß der fermentierte Tabak lagerfähig ist.

Die *abnehmende Geschwindigkeit* ist darum das sichere Charakteristikum der *autolytischen Gärung*.

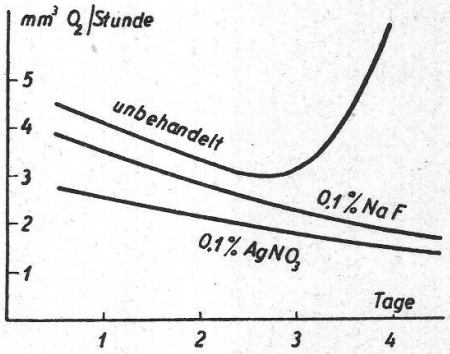
Der mikrobiellen Gärung muß die Quellung, das Wachstum und die Vermehrung der in trockenheitsbeständigen Dauerformen anwesenden

[1] Die Fachliteratur verwendet an dieser Stelle den Ausdruck « enzymatisch ». Da aber auch die mikrobielle Gärung durch Enzyme verursacht wird, verwenden wir für den durch die blatteigenen Enzyme bewirkten Gärvorgang die Bezeichnung « autolytisch ».

Mikroorganismen vorausgehen. Die dazu nötige Zeit hängt vor allem von der zur Verfügung stehenden Wassermenge ab. Während bei der autolytischen Gärung für die verbrauchten Enzyme kein Ersatz möglich ist, werden von den Mikroben nach Ablauf der ersten Entwicklung in gewaltig ansteigendem Maß Enzyme geliefert, die von außen her den Abbau der Gärsubstrate einleiten. Für die *mikrobielle Gärung* ist daher in der Anfangsphase die *steigende Geschwindigkeit* charakteristisch. Diese Geschwindigkeit erreicht mit der völligen Durchsetzung des Gärgutes durch die Mikroben ihren Maximalwert, um darauf rasch zu sinken.

Diese Deutung der Gärkurve als Summenkurve wird am besten bewiesen durch die experimentelle Aufnahme der beiden Einzelkurven.

Die reine Autolyse ist leicht zu erhalten durch Zusatz eines Antiseptikums zum Gärgut. Wir versuchten zuerst eine völlige Sterilisation zu erreichen und das Antiseptikum darauf zu entfernen. Das von



Figur 4
Hemmung der Mikrobengärung durch NaF, resp. $AgNO_3$

Schweizer (11) besonders für solche Fälle entwickelte Kaltsterilisationsverfahren versagte jedoch restlos. Das Blattmaterial war auch nach eintägiger Aufbewahrung in Chloroform nicht steril. Wir verzichteten darum auf völlige Keimfreiheit und verwendeten kleine Mengen schwacher Antiseptika, die während der Messung auf dem Blattmaterial blieben und bei geringer Enzymhemmung die Entwicklung der Mikroorganismen verhinderten.

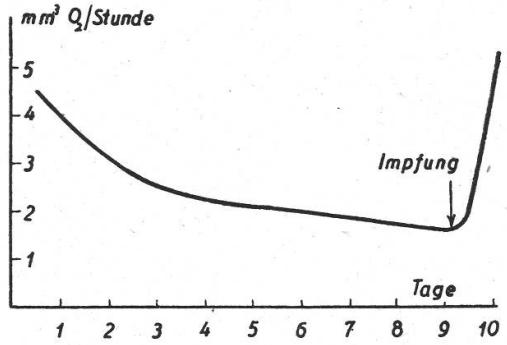
Die besten Resultate lieferte Natriumfluorid. Wir haben eine verdünnte Lösung auf dem Tabak kalt im Exsikkator eintrocknen lassen, so daß, berechnet auf Blatttrockensubstanz, 0,1% Natriumfluorid zurückblieb. Dieses Material zeigte bei geringer Hemmung der Autolyse keinerlei Anzeichen von mikrobieller Gärung (Figur 4). Ebenfalls noch verwendbar war Silbernitrat, das aber auf die autolytischen Enzyme schon stärker giftig wirkte. Leichtflüchtige, besonders organische Verbindungen wie Chloroform und Toluol konnten bei der Messung ohne Aufschlämmung wegen ihres hohen Dampfdruckes nicht verwendet werden.

Daß der Anstieg der Gärkurve auf Mikrobentätigkeit zurückzuführen ist, hofften wir so zu beweisen, daß durch Hitzesterilisierung sowohl

Keime als Enzyme abgetötet wurden, worauf eine künstliche Reinfektion den Anstieg der Kurve bringen sollte. Diese reine Mikrobengärung, die Johnson beobachtet zu haben glaubt, war nicht zu erhalten, da es nicht möglich war, durch Hitze das Blattmaterial gärunfähig zu machen. Die Gründe dafür werden in Abschnitt 4 erörtert. Der in Figur 5 dargestellte Versuch erbringt trotzdem den Beweis: Das verwendete Blattmaterial war während zwei Stunden einer Temperatur von 125° ausgesetzt worden. Impfungen auf verschiedene Nährböden ergaben völlige Keimfreiheit. Dementsprechend blieb auch der Kurvenanstieg aus und setzte erst nach Beimpfung aus einer gärenden Probe ein.

b) Die Bedeutung der mikrobiellen Gärung für die praktische Fermentation

Wir stellten uns anfänglich den allgemeinen Fall des Fermentationsvorganges als geichzeitigen Ablauf eines autolytischen und eines mikrobiellen Gärprozesses vor, wobei das Verhältnis der Anteile der beiden



Figur 5
Gärverlauf bei hitzesterilem Material, am 10. Tag beimpft

Prozesse am Gesamtvorgang durch die äußeren Reaktionsbedingungen verändert werden könne. Eine solche Anschauung ergibt sich aus den meisten neueren Arbeiten über dieses Thema.

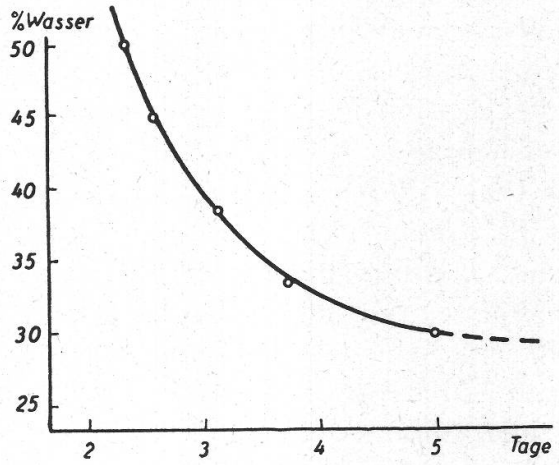
Die Bestimmung des Anteiles der beiden Prozesse ist nun tatsächlich möglich durch Extrapolation der rein autolytischen Gärgeschwindigkeit und Subtraktion des gefundenen Wertes von dem zur betreffenden Zeit im Versuch beobachteten Geschwindigkeitswert. Solche Bestimmungen sind indessen praktisch bedeutungslos, da eine andere Gesetzmäßigkeit, die aus allen Versuchen hervorging, von ungleich größerer Bedeutung ist:

Wenn die Reaktionsbedingungen innerhalb einer Frist von zirka einer Woche überhaupt den meßbaren Eintritt einer mikrobiellen Gärung erlauben, dann steigert sich diese stets in kurzer Zeit zu einer Geschwindigkeit, die der Autolysengeschwindigkeit um das Fünf- bis Fünfzigfache überlegen ist. Den Fall, daß die beiden Vorgänge mit ähnlichem Ausmaß nebeneinander verlaufen, so daß eine ungefähr horizontale Gärkurve resultieren würde, haben wir nie beobachtet. Es handelt sich dabei wohl nicht um einen unmöglichen, aber seltenen Spezialfall.

Wir stellten fest, daß es für jedes Material einen kritischen Wert des Wassergehaltes gibt, unterhalb welchem keinerlei Anzeichen einer Mikrobengärung zu beobachten sind. Wird er dagegen nur wenig überschritten, so ist nach einigen Tagen die mikrobielle Gärung der unbedingt vorherrschende Vorgang. Während man die Geschwindigkeit der autolytischen Gärung durch die Wahl der Reaktionsbedingungen weitgehend bestimmen kann, erlaubt das gleiche Vorgehen die Mikrobengärung lediglich zuzulassen oder auszuschalten.

Angesichts dieser Beobachtung ist es zweckmäßiger, statt nach dem Anteil einer Mikrobengärung nach den Bedingungen ihres Eintrittes zu fragen.

Figur 6 zeigt, wie bei einem bestimmten Blattmaterial der Zeitpunkt des Eintrittes der mikrobiellen Gärung vom Wassergehalt abhängt.



Figur 6
Zeitpunkt des Eintrittes der Mikrobengärung bei verschiedenen Blattfeuchtigkeiten

Unterhalb zirka 29 % können wir den Eintritt nicht mehr scharf erfassen. Wir sehen aber, daß die Kurve bei zirka 28 % asymptotisch wird. Bei weniger als 28 % Wasser ist also für das betreffende Material bei der Versuchstemperatur von 40° keine mikrobielle Gärung mehr zu erwarten.

In der Technik wird der Tabak in der Regel mit weniger als 25 % Wasser zur Fermentation angesetzt. Dieser Wassergehalt wird durch das entstehende Oxydationswasser nur unwesentlich erhöht. Gleichzeitig werden aber schon im Verlauf der ersten Tage meist Temperaturen über 50° erreicht, so daß die Entwicklungsbedingungen für die Mikroorganismen noch wesentlich ungünstiger sind als bei unseren Versuchen.

Wir sehen daraus, daß die *mikrobielle Gärung* für den normalen praktischen Fermentationsvorgang *nicht von Bedeutung* sein kann.

Damit ist die auf Grund rein theoretischer Überlegungen gewonnene Ansicht von Frey-Wyßling (3) experimentell vollkommen bestätigt.

4. Der Einfluß der Wärmevorbehandlung auf die Gärfähigkeit des Tabaks

a) Bisherige Anschauungen

Als Auswirkung der Wärmevorbehandlung auf trockenen Tabak wird man sich zunächst etwa folgendes vorstellen:

Mit steigender Temperatur und steigender Dauer der Vorbehandlung wird in zunehmendem Maße eine Schädigung der Fermentsysteme eintreten. Man wird bei bestimmter Einwirkungsdauer eine Temperaturgrenze erwarten können, oberhalb welcher sowohl blatteigene Enzyme als auch Keime von Mikroorganismen restlos abgetötet werden, so daß das betreffende Blattmaterial bei den normalen Fermentationstemperaturen auch bei Anwendung hoher Feuchtigkeiten völlig gärunfähig bleiben wird, sofern eine Reinfektion nicht eintreten kann.

Von solchen Überlegungen ist zum Beispiel Johnson (5) ausgegangen. Er gibt tatsächlich an, daß nach « genügender » Erwärmung beim Fermentationsversuch keine Erwärmung mehr festzustellen sei. Temperatur und Erhitzungsdauer gibt er leider nicht an. Das Ergebnis ist bei Berücksichtigung der geringen Meßgenauigkeit der kalorimetrischen Methode, die Johnson verwendete, zu verstehen.

Ihm widersprechen die übereinstimmenden Angaben von Jensen (10), Cohen (12) und Boekhout und Ott de Vries (13), daß Fermentierung auch nach längerer Einwirkung einer Temperatur von 100°, ja sogar nach zweistündigem Aufenhalt in Wasserdampf von 100°, noch möglich sei. Diese Beobachtungen waren die Hauptstützen der heute völlig verlassenen Oxydationstheorie der Fermentation, die den Fermentationsvorgang mit einer rein chemischen Oxydation, vielleicht katalysiert durch Mangan- und Eisensalze, zu erklären versuchte. Obwohl die Oxydationstheorie sicher zu Recht durch die Enzymtheorie verdrängt wurde, sind einige Argumente ihrer Verfechter sehr zu Unrecht in Vergessenheit geraten, vor allem die angeführten experimentellen, rein objektiven Beobachtungen.

Sie scheinen zwar erklärt und mit der Enzymtheorie in Einklang gebracht zu werden durch spätere Arbeiten über die Thermostabilität der Blattenzyme:

Bodnar und Villanyi (14) berichten, daß kohlehydratspaltende Enzyme durch Erhitzung des Tabakblattes auf 100° nur wenig geschädigt würden. Neuberg und Kobel (15) fanden, daß die Röhrentrocknung, deren Temperaturmaximum ebenfalls bei 100° liegt, nur geringe Aktivitätsverluste von Amylase, Invertase, Phosphatase, Glykolase und Ketonaldehydmutase zur Folge hat. Dazu ist aber zu bemerken, daß hier trockene Hitze angewendet wurde, während insbesondere Jensen mit überhitztem Wasserdampf experimentiert hat. Wie noch zu zeigen sein wird, ist dieser Unterschied entscheidend wichtig. Ferner betrafen die Arbeiten von Neuberg nicht die Gärfähigkeit

des vorbehandelten Tabaks selbst, sondern seine spezifischen Enzymwirkungen auf künstlich hergestellte Lösungen bestimmter Substrate.

Daß diese Unterscheidung von großer Bedeutung ist, zeigen die Arbeiten von Obabko (16) und Svirin (17) (russische, uns nicht zugängliche Literatur, referiert durch Frankenburg [2] und Chemical Abstracts).

Obabko erwärmte Tabak mit 25—28 % Wasser auf 60—75° (die Erwärmungsdauer wird nicht angegeben) und stellte fest, daß seine Sauerstoffaufnahmefähigkeit dadurch nur wenig reduziert wurde. Der wässerige Extrakt solcher Blätter zeigte jedoch, verglichen mit Extrakten aus unbehandelten Blättern, fast völlige Inaktivierung der Oxydase. Höhere Erhitzung, bis 125°, stellte die Sauerstoffaufnahmefähigkeit der Blätter wieder her, während das bei den Extrakten nicht der Fall war. Obabko vermutet, daß unter dem Einfluß der Hitze leicht oxydierbare Verbindungen entstehen. Anhaltspunkte für diese Vermutung nennt er keine.

Svirin fand nach Erhitzung auf 80° einen Verlust der Blätter an Sauerstoffaufnahmefähigkeit von 24—55 %, während die Oxydaseaktivität des Extraktes dieser Blätter um 80—96 % reduziert worden war. Er schließt aus dieser Differenz, daß in den Blättern außer der enzymatischen auch eine rein chemische Oxydation vor sich gehen müsse.

Frankenburg gibt für das verschiedene Verhalten der Oxydaseaktivität in den Blättern gegenüber den Extrakten zwei Erklärungsmöglichkeiten an:

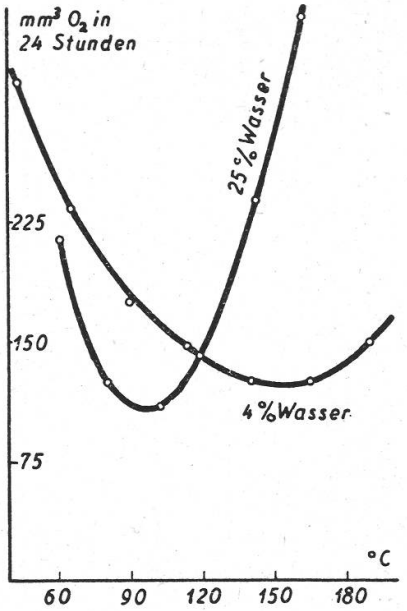
1. In den Blättern existieren zwei unabhängige Oxydationssysteme. Eventuell behält die fester an das Blatteiweiß gebundene Cytochromoxydase ihre Aktivität, während die extrahierbare Polyphenoloxydase inaktiviert wird.
2. Durch die Erhitzung wird die Extrahierbarkeit der Oxydase verändert.

Die Wiederherstellung der Oxydierbarkeit durch die Hitzeeinwirkung erklärt Frankenburg durch die Bildung autoxydabler Substanzen, wobei er insbesondere mit der Bildung von Phenolen rechnet, und ferner mit der Anwesenheit nichtenzymatischer, hitzebeständiger Katalysatoren.

b) Die Gärfähigkeit des Tabaks nach Wärmevorbehandlung

Bei unseren Versuchen, die Gärfähigkeit des Tabaks durch Erhitzen auszuschalten, um darauf durch Reinfektion die reine Mikrobengärung zu erhalten, stellten wir fest, daß die Gärfähigkeit durch den Einfluß der Hitze zwar reduziert wurde, jedoch nicht unter zirka 30 % ihres Wertes vor der Wärmebehandlung gebracht werden konnte. Stärkere Erhitzung bewirkte stets eine Steigerung der Gärfähigkeit.

Es zeigte sich, daß für das Ausmaß der Veränderung, die durch die Vorbehandlung bewirkt wurde, der Wassergehalt von ausschlaggebender Bedeutung war. Um diese Verhältnisse genauer abzuklären, haben wir eine größere Anzahl Proben in Ampullen eingeschmolzen, wobei je eine Serie von sechs Proben den gleichen Wassergehalt erhielt. Die einzelnen Proben einer Serie wurden während zweier Stunden verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Darauf bestimmten wir ihre Gärgeschwindigkeiten bei 40° und einheitlich mit 30 % Wassergehalt, da nur der Einfluß des Wassergehaltes während der Vorbehandlung zu untersuchen war. Die Gärgeschwindigkeiten, aufgetragen über den entsprechenden Temperaturen der Wärmevorbehandlung, ergaben für jede Serie mit konstantem



Figur 7
Gärgeschwindigkeit nach Wärmevorbehandlung bei verschiedenem Wassergehalt

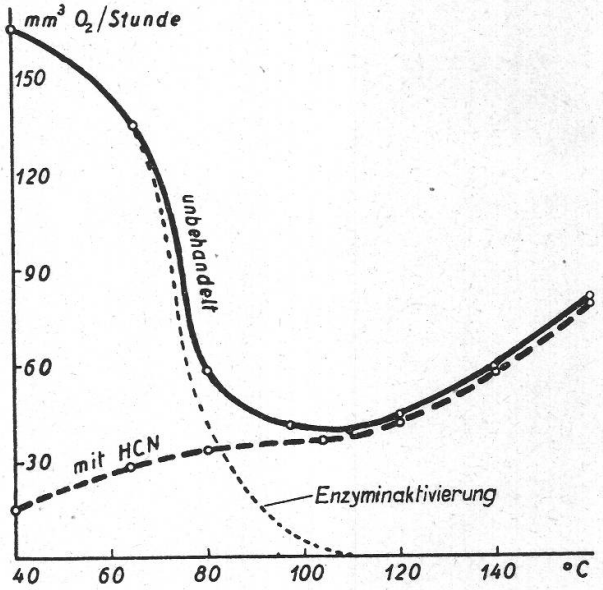
Wassergehalt eine Kurve; im gesamten also eine Kurvenschar mit der Blattfeuchtigkeit als Parameter. In Figur 7 sind zwei Kurven dieser Schar wiedergegeben. Charakteristisch ist, daß die Kurven ein Minimum durchlaufen, das sich mit abnehmendem Wassergehalt nach höheren Temperaturen der Vorbehandlung und gleichzeitig nach höheren Gärgeschwindigkeiten verschiebt, wobei es flacher wird. Bei Feuchtigkeiten von mehr als 40 % werden die Kurven praktisch identisch. Ihr Minimum liegt dann bei zirka 88°.

Schon die Form der Kurven brachte uns auf die Vermutung, es könnten wieder Summenkurven vorliegen wie bei den Gärkurven (Figur 3). Der absteigende Ast müßte dabei die Hitzeinaktivierung der Enzyme zeigen, während der aufsteigende Ast nur mit einem neuen, durch die Hitze hervorgerufenen, nichtenzymatischen Gärvorgang zu erklären wäre.

Tatsächlich läßt sich sofort zeigen, daß zwei grundsätzlich verschiedene Vorgänge einander ablösen und sich im Temperaturgebiet des Kurvenminimums überschneiden:

Falls der erste der beiden Vorgänge durch Atmungsenzyme bewirkt wurde, so mußte er sich durch Blausäure weitgehend hemmen lassen. Zeigte der zweite Vorgang dagegen keine Blausäurehemmung, so war sein nichtenzymatischer Charakter mit großer Sicherheit nachgewiesen.

Diese Erwartung wurde durch das Experiment bestätigt: Wir haben zwei Probenserien mit gleichem Material und gleichem Wassergehalt (10 %) angelegt und beide mit abgestuften Temperaturen zwei Stunden lang vorerhitzt. Darauf wurden die Proben der ersten Serie wie üblich, die der zweiten mit Blausäure zur Gärung angesetzt. Figur 8 zeigt die

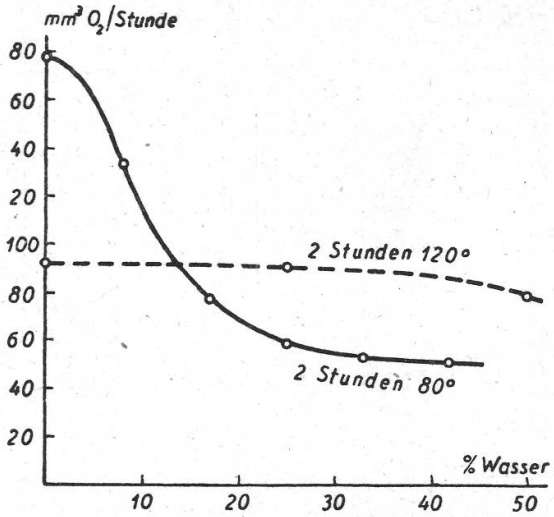


Figur 8
Gärgeschwindigkeit nach Wärmevorbehandlung bei 10 % Wassergehalt, gemessen mit und ohne Blausäurezusatz

Temperaturkurven der Gärgeschwindigkeiten der beiden Serien. Die Gärgeschwindigkeit des Materials, das keine Wärmevorbehandlung erfahren hatte, ließ sich durch Blausäure auf zirka 10 % reduzieren (Geschwindigkeitswerte bei 40°). Der nichthemmbare Anteil der Gärung ist wahrscheinlich auf blausäureunempfindliche Enzyme zurückzuführen. Die Vorbehandlung mit 60—80° hatte eine starke Hitzeinaktivierung bewirkt. Die Gärung ließ sich aber mit Blausäure in bedeutend geringerem Maße hemmen. Es mußte also in diesem Gebiet bereits ein nichtenzymatischer Vorgang beteiligt sein. Nach höheren Vorbehandlungstemperaturen näherten sich die beiden Gärgeschwindigkeiten immer mehr, um bei zirka 110° den gleichen Wert zu erreichen. Nach noch stärkeren Erhitzungen zeigte Blausäure keine hemmende Wirkung mehr. Wir schlossen daraus, daß die Temperatur von 110° diejenige Hitze angibt, die bei zweistündiger Einwirkung und bei 10 % Blattfeuchtigkeit den Fermentkörper des Tabaks vollständig inaktiviert. Wir konn-

ten also die Fermentinaktivierungskurve in der angegebenen Art (in der Figur punktiert) extrapolieren.

Nach den in Figur 7 dargestellten Ergebnissen hat man neben der Temperatur bei der Wärmevorbehandlung auch die Blattfeuchtigkeit zu berücksichtigen. Um ihren Einfluß kennenzulernen, haben wir zwei Probenserien eingeschmolzen, wobei innerhalb jeder Serie der Wassergehalt des Tabaks von 0—50 % abgestuft war. Die eine Serie wurde auf 80° erhitzt, die zweite auf 120°. Dabei liegt die erste Temperatur noch sicher im Bereich der absteigenden Kurve (tiefste Temperaturlage des Minimums 88°), also in einem Bereich, in welchem unter allen Bedingungen zum mindesten noch eine geringe autolytische Gärung zu erwarten ist, während im Bereich der zweiten Temperatur mit einer solchen nicht mehr zu rechnen ist. Darauf wurden sämtliche Gär-



Figur 9
Einfluß der Wärmevorbehandlungen mit 80° u. 120° auf die Gärgeschwindigkeit bei verschiedenen Feuchtigkeiten

geschwindigkeiten bei 40° bestimmt. Das in Figur 9 dargestellte Resultat zeigt, daß die bei 80° stattfindende Enzyminaktivierung stark feuchtigkeitsabhängig ist. Das völlig trocken erhitzte Material unterschied sich in der Gärgeschwindigkeit nur wenig von unbehandeltem Material. Aber schon bei geringen Feuchtigkeiten setzte die Inaktivierung sehr stark ein und war bei 25 % fast vollständig. Der Endwert, dem die Kurve asymptotisch zustrebt, stellt nicht einen thermostabilen Anteil der gesamten Fermentaktivität dar, sondern bereits den Anteil des nichtenzymatischen Gärvorganges. Nach der Vorbehandlung mit 120° verbleibt nur dieser zweite Vorgang, jedoch nun mit ungefähr doppelter Intensität. Von entscheidender Bedeutung ist aber, daß die Feuchtigkeitskurve dieses Vorganges (die gestrichelte Kurve) im Bereich der praktisch in Frage kommenden Blattfeuchtigkeiten *horizontal* verläuft. Dies bedeutet, daß die Feuchtigkeit hier heinen Einfluß hat: der nichtenzymatische Gärvorgang wird allein durch die Hitzeeinwirkung verursacht. Erst höhere Feuchtigkeit scheint den Hitzeeinfluß zu vermindern,

während bei 80° umgekehrt steigende Feuchtigkeit die Hitzeeinwirkung verstärkte. Auf die Ursache dieses Unterschiedes kommen wir in Abschnitt 4 *c* zurück.

Während der nichtenzymatische Gärvorgang bei Feuchtigkeiten unterhalb 40 % ursächlich feuchtigkeitsunabhängig ist, ist sein Verlauf, den wir wieder bei 40° untersuchten, feuchtigkeitsabhängig genau wie der enzymatische Vorgang, d. h. seine Geschwindigkeit steigt im Bereich mittlerer Feuchtigkeiten ebenfalls ungefähr proportional mit dem Wassergehalt. Die beiden Gärvorgänge scheinen einander auch sonst in ihrem Ablauf (nicht in ihrer Ursache!) sehr ähnlich zu sein. Wir schließen das aus folgendem Versuch: Wir haben bei einer Erhitzungsreihe mit Vorbehandlungstemperaturen von 50—150° Parallelbestimmungen der Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe durchgeführt. Wir erwarteten, daß die beiden Vorgänge auch auf Grund solcher Messungen zu unterscheiden sein würden, indem der Atmungskoeffizient, d. h. das Verhältnis Kohlensäureabgabe : Sauerstoffaufnahme innerhalb der Erhitzungsreihe seinen Wert ändern würde. Das Verhältnis zeigte jedoch keinerlei Abhängigkeit von der Temperatur der Vorbehandlung und schwankte nur innerhalb der Meßgenauigkeit von 0,55 bis 0,56. Dieses gleichartige Verhalten mag dazu beigetragen haben, daß die nichtenzymatische bisher neben der enzymatischen Gärung übersehen wurde.

Wenn wir uns die Bedingungen der künstlichen Trocknung oder des Redry-Prozesses vergegenwärtigen, so müssen wir damit rechnen, daß die nichtenzymatische Gärung am nachfolgenden Fermentationsprozeß mit einem Anteil von 30—80° beteiligt ist. Absolut wird dieser Anteil für ein bestimmtes, schematisiertes Verfahren weitgehend konstant sein, da er nicht feuchtigkeitsabhängig ist. Relativ wird er dagegen gewisse Schwankungen aufweisen, da die Enzyminaktivierung auch bei genau schematisiertem Vorgehen je nach Eigenart des Materials und je nach Luftfeuchtigkeit ein verschiedenes Ausmaß annehmen wird.

Auskunft über die Anteile der beiden Vorgänge gibt der Gärversuch, der parallel mit und ohne Blausäure durchgeführt wird.

c) Untersuchung des nichtenzymatischen Gärvorganges

Worauf beruht nun der durch Hitzevorbehandlung verursachte nichtenzymatische Gärvorgang?

Wir stellen zuerst die Erklärungsmöglichkeiten zusammen, die aus den bisherigen, in Abschnitt 4 *a* kurz erörterten Arbeiten hervorgehen. Den Erklärungsversuch mit der Thermostabilität der Enzyme übergehen wir, da dieser Fragenkomplex in Abschnitt *b* abgeklärt worden ist. Dann verbleiben:

1. Die Fermentation ist ein chemischer Oxydationsvorgang, katalysiert durch anorganische Katalysatoren, vor allem Eisen- und

Mangansalze (Boekhout, de Vries, Cohen). Diese für den autolytischen Teil der Gärung widerlegte Erklärung könnte für den von uns als nichtenzymatisch erkannten Teil Geltung haben.

2. Neben den Enzymen bestehen nichtenzymatische Katalysatoren, oder durch die Hitzeeinwirkung werden solche erzeugt (Frankenburg). Da die Gärgeschwindigkeit nach stärkerer Erhitzung höher ist, müßte der Katalysator durch die Erhitzung gebildet werden.
3. Bei der Erhitzung entstehen leicht oxydierbare Substanzen (Obabko, Svirin) oder direkt autoxydable Substanzen, zum Beispiel Phenole (Frankenburg).

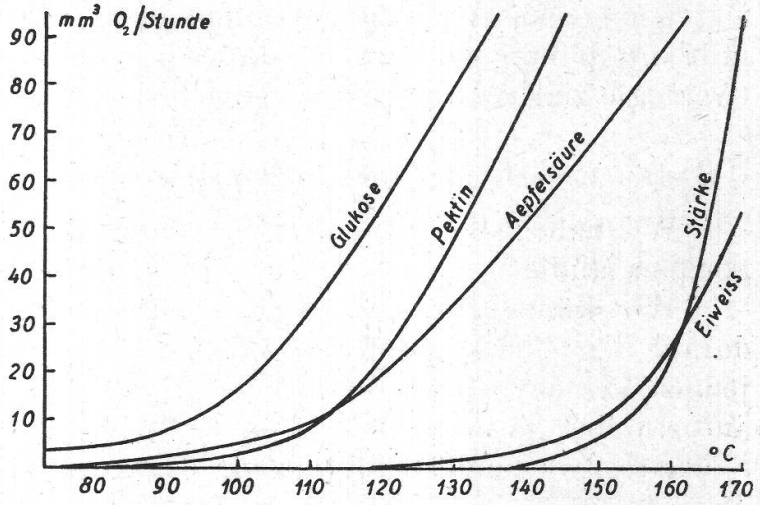
Die Beobachtung, daß die autolytische Gärung (ohne Wärmevorbehandlung) sich durch Eisensalze beschleunigen läßt, machte uns anfänglich die erste oder zweite Erklärung wahrscheinlich, d. h. daß ein nichtenzymatischer Sauerstoffüberträger vorhanden sei. Das Eisen als Bestandteil dieses Überträgers oder als Überträger selbst könnte zwar dabei nicht die gleiche Rolle spielen wie in den eisenhaltigen Enzymen (Wertigkeitswechsel!), denn andernfalls hätte Blausäure auf die Gärung hemmend wirken müssen. Wir erwarteten, daß erhitzter Tabak, der also diesen Überträger enthalte, auch künstlich zugeführtes Substrat würde vergären können.

Die Versuche ergaben jedoch nicht das erwartete Resultat: Wir haben auf 150° vorerhitzten Tabak bei 55° und 30 % Wassergehalt durchfermentiert, bis die Gärgeschwindigkeit noch 8 % ihres Anfangswertes betrug (Dauer zirka 6 Tage). Darauf haben wir das Blattmaterial mit Lösungen von Stoffen angesetzt, die als Gärsubstrate in Frage kamen: Glukose, Pektin, Aminosäuren, Stärke. Die auf 8 % reduzierte Gärgeschwindigkeit ließ sich dadurch nicht erhöhen. Diese Tatsache konnte immer noch damit erklärt werden, daß der Katalysator während der durch ihn bewirkten Gärung seine Aktivität eingebüßt habe.

Wir haben darum das durchfermentierte Material ein zweitesmal erhitzt. Darauf konnten wir eine fünfmal höhere Gärgeschwindigkeit feststellen (= 40 % des Wertes nach der ersten Erhitzung). Wurde diese zweite Gärung statt in Wasser in einer der genannten Substratlösungen durchgeführt, so war wiederum keine erhöhte Geschwindigkeit zu messen. Wurde hingegen das Material schon vor der zweiten Erhitzung mit einer einprozentigen Glukoselösung getränkt, kalt getrocknet und darauf samt der eingetrockneten Glukose erhitzt, so ergab sich die gleiche Gärgeschwindigkeit wie nach der ersten Erhitzung, d. h. verglichen mit dem ohne Glukose erhitzten Material mehr als die doppelte Geschwindigkeit. Damit wurde es wahrscheinlich, daß durch die Hitzeeinwirkung nicht ein Katalysator entstand, sondern die Substrate direkt verändert, d. h. leichter oxydierbar wurden.

Wir haben die Lösungen, die nach der Erhitzung auf dem Blattmaterial die starke Gärung ergaben, in reinem Zustand in Ampullen eingeschmolzen und erhitzt. Sie zeigten zwar starke Veränderungen (Dunkelfärbung), nahmen aber bei 40° keinen Sauerstoff auf. Daraus war zu schließen, daß die Substrate die geeignete Veränderung nur im adsorbierten, nicht im gelösten Zustand erfahren konnten. Wenn dieser Schluß zutraf, dann mußte an Stelle des Blattmaterials auch ein anderes Adsorbens die geeigneten Bedingungen für diese Veränderung schaffen. Wir versuchten daher, den Vorgang im Modellversuch nachzuahmen.

Die Substratlösungen wurden mit Carbo adsorbens gründlich vermengt und im Exsikkator kalt getrocknet, bis die Kohle wieder pulvrig wurde. Sie enthielt dann 15 % adsorbierte Substanz. Von diesen Kohle-



Figur 10
Oxydationsgeschwindigkeit auf Kohle adsorbierter Gärsubstrate nach Wärmevorbehandlung

präparaten wurden Erhitzungsreihen angelegt analog den in Abschnitt *b* (Figur 7) beschriebenen, jedoch ohne besondere Berücksichtigung des Wassergehaltes. Die Proben gelangten nach der Erhitzung mit 3 cm³ chloroformgesättigtem Wasser in die Meßgefäße. Da die Aktivkohle selber Sauerstoff aufnimmt, wurde auch eine Erhitzungsreihe mit unbehandelter Kohle untersucht. Von jedem an einem Präparat gemessenen Geschwindigkeitswert wurde der Wert für reine Aktivkohle subtrahiert. Die Gärgeschwindigkeiten zeigten nach dieser Korrektur eine in Figur 10 wiedergegebene Abhängigkeit von der Temperatur der Vorbehandlung. Blausäure bewirkte in keinem Fall eine Hemmung. Wir stellen also die eigenartige Tatsache fest, daß jedes Gärsubstrat im adsorbierten Zustand oberhalb einer gewissen kritischen Temperatur so verändert wird, daß es darauf bei 40° oxydierbar ist. Bei den einfachen Zuckern und den organischen Säuren scheint diese Veränderung am leichtesten einzutreten, während die Eiweißstoffe (Pepton, Eialbumin und Leuzin reagierten gleich) dazu höhere Temperaturen erfordern.

Es wird damit verständlich, warum das Ausmaß der Veränderung zunächst feuchtigkeitsunabhängig ist, um erst durch höhere Feuchtigkeit merklich verringert zu werden: Absolute Trockenheit stellt einen Grenzfall dar, indem die löslichen Substrate dann am stärksten adsorbiert sind. Der andere Grenzfall ist der Zustand der reinen Lösung, in welchem die Veränderung nicht eintreten kann. Durch die Anwesenheit von Wasser im Blattgewebe kommt ein Zwischenstadium zustande. Es braucht indessen größere Wassermengen, um die Adsorption merklich zu schwächen. In Blättern mit 0—25 % Wasser sind die Substrate noch vollkommen adsorbiert. Die Wärmebehandlung bewirkt darum in solchem Material die gleichen Veränderungen.

Wir haben an Stelle der Aktivkohle auch die Wirksamkeit anderer Adsorbentien untersucht. Die gleichen Veränderungen erhielten wir auf Kieselgur, jedoch mit sechsmal geringerem Ausmaß. Völlig unwirksam waren dagegen reine Zellulose und ebenso reines Aluminiumoxyd. Es fällt auf, daß die wirksamen Adsorbentien eisen- und stickstoffhaltig sind (Analogie zum Warburgschen Modell des Atmungsfermentes ?).

d) Die Ursache der nichtenzymatischen Oxydierbarkeit der Glukose

Wir haben die Natur der Hitzeeinwirkung am Beispiel der Glukose genauer studiert.

Wir können Aktivkohle mit adsorbierter Glukose erhitzen und darauf den Zucker wieder in Wasser lösen. Dieses Filtrat allein nimmt jedoch keinen Sauerstoff auf. Die Hitze macht also die Glukose nicht autoxydabel (autoxydabel ist ein Stoff, der sich direkt mit molekularem Sauerstoff verbindet). Setzen wir dagegen dem Filtrat neue, unbehandelte Aktivkohle zu, so setzt die Oxydation sofort ein. Erhitzen wir die Glukoselösung allein und setzen ihr nachher Aktivkohle zu, so ist wieder keine Reaktion zu bemerken; auch dann nicht, wenn wir der allein erhitzten Glukoselösung allein erhitzte Kohle zusetzen.

Damit ist noch klarer als beim Versuch mit Tabak erwiesen, daß die Hitze eine Veränderung des Gärsubstrates bewirkt, jedoch nur dann, wenn dieses Substrat adsorbiert ist. Ferner zeigt sich, daß das Produkt der Veränderung nicht direkt Luftsauerstoff aufnimmt, sondern nur aktivierten Sauerstoff. Eine geeignete Aktivierung stellt der Oberflächenkontakt mit Aktivkohle dar.

Die Kontaktaktivierung des Sauerstoffes ist in neuerer Zeit von Yamafuji (18) untersucht worden. Der Forscher kommt zur Vorstellung, daß das Sauerstoffmolekül beim Zusammenstoß mit der Oberfläche eines geeigneten Festkörpers angeregt wird. Er verwendete für seine Versuche zum Beispiel getrocknetes pflanzliches und tierisches Gewebe, Knochenkohle oder Talk, alles eisenhaltige Stoffe. Geeignet war auch metallisches Eisen, ferner Zink. Obwohl Eisen oder ein anderes geeignetes Metall zum mindesten in Spuren anwesend sein mußte, hatte

Blausäure, das spezifische Gift für Eisenkatalysatoren, keine hemmende Wirkung. Die Kontaktaktivierung des Sauerstoffs hat also mit dem von Warburg (19) entdeckten Wertigkeitswechsel des Eisens nichts zu tun. Yamafuji glaubt ferner, daß diese Kontaktaktivierung auch für enzymatische Oxydationen von größter Bedeutung sei, indem gewisse sauerstoffübertragende Fermentsysteme nur bei Gegenwart von aktiviertem Sauerstoff aktiv seien.

Die Aktivkohle und im Tabak das Blattgewebe erfüllen also beim nichtenzymatischen Gärvorgang gleichzeitig zwei verschiedene Aufgaben: Zuerst liefern sie die Adsorptionsbedingungen für die Veränderung der Substrate, darauf aktivieren sie den Luftsauerstoff durch Oberflächenkontakt und katalysieren damit die Oxydation.

Unbeantwortet ist nun noch die Frage, was für eine Veränderung die adsorbierte Glukose unter der Hitzeeinwirkung erleidet.

Eine hydrolytische, oxydative oder reduktive Veränderung können wir mit großer Sicherheit ausschließen:

Gegen eine hydrolytische Veränderung spricht die Tatsache, daß das scharf getrocknete Material gleich reagiert wie das lufttrockene. Eine oxydative Veränderung müßte an ihrer Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck zu erkennen sein. Wir haben deshalb glukosehaltige Kohle in evakuierten, ferner in stickstoff-, wasserstoff- und sauerstoffgefüllten Ampullen erhitzt. Die Resultate der ersten drei Versuche waren praktisch identisch, während nach der Erhitzung in der Sauerstoffatmosphäre nur die halbe Oxydationsgeschwindigkeit zu messen war. Der bei der Erhitzung anwesende Sauerstoff erzeugt also nicht, sondern verbraucht das Veränderungsprodukt.

Bei einer reduktiven Veränderung auf der Aktivkohle wäre Kohlendioxyd als Reaktionsprodukt zu erwarten. Beim Öffnen der evakuierten oder stickstoffgefüllten Ampullen war jedoch keine Kohlensäure nachzuweisen.

Sicher ist dagegen, daß bei der Erhitzung Wasser abgespalten wird. Dieser unter dem Namen Karamelisierung bekannte Vorgang findet jedoch auch bei der Erhitzung fester Glukose oder einer wässerigen Lösung von Glukose statt. Er liefert keine leichter oxydierbaren Produkte. Die Karamelisierung ist auch bei der Erhitzung unserer Kohlepräparate der bei weitem vorherrschende Vorgang. Nach zweistündiger Erhitzung auf 160° können wir zum Beispiel von der adsorbierten Glukose nur noch 20—30 % eluieren; der Rest bleibt in Form hochmolekularer Karamelisierungsprodukte auf der Kohle. Der leicht oxydierbare Stoff geht in Lösung, scheint also kein Karamelisierungsprodukt zu sein. Es verbleibt freilich die Erklärungsmöglichkeit, daß bei der adsorbierten im Gegensatz zur kristallisierten und gelösten Glukose außer der gewöhnlichen Karamelisierung noch eine anders verlaufende Wasserabspaltung stattfinde, die zu einer ungesättigten Verbindung führe. Wir

halten diese Anschauung nicht für wahrscheinlich, können sie jedoch angesichts der erheblichen experimentellen Schwierigkeiten nicht sicher widerlegen.

Auf Grund unserer Versuche müssen wir annehmen, daß die Veränderung nicht in einer Wasserabspaltung, sondern in einer *Isomerisierung* besteht, indem die teilweise Umwandlung von Glukose in Fruktose und wenig Mannose, die in warmen alkalischen Lösungen nachgewiesen ist (Wolfrom, 20), auch bei adsorbierter Glukose eintreten kann.

Wir haben zum Beispiel 9 g Kohle mit 30 % adsorbierter Glukose im Vakuum 2 Stunden auf 150° erhitzt und darauf mit 40 cm³ Wasser von 35° unter Luftabschluß eluiert. Die Lösung, die theoretisch zirka 6,5prozentig hätte sein sollen, lieferte einen Trockenrückstand von 3,30 %. Die Bestimmung der gesamten reduzierenden Substanzen ergab unter der Annahme, daß nur Hexosen anwesend seien, eine Konzentration von 3,18 %. In dieser Lösung stellten wir mit Hilfe der beiden kolorimetrischen Verfahren mit salzsaurem Resorzin und mit alkoholischem, salzsaurem Diphenylamin übereinstimmend 0,14 % *Fruktose* fest. Wir nahmen an, daß die Lösung demnach 3,04 % Glukose und 0,14 % Fruktose enthalte, und errechneten daraus einen optischen Drehwinkel von + 1,46° bei einer Rohrlänge von 10 cm. Unsere Lösung zeigte einen Drehwinkel von + 1,45°.

Dieses Ergebnis spricht stark für Isomerisierung von Glukose in Fruktose. Von der Fruktose wissen wir seit langer Zeit, daß sie leichter oxydierbar ist als Glukose. Seit den Arbeiten von Yamafuji wissen wir zudem, daß sie durch kontaktaktivierten Sauerstoff oxydierbar ist, während das für Glukose nicht zutrifft.

Der Fruktosegehalt der Kohlepräparate erreichte nach einer Erhitzungsdauer von zirka 100 Minuten sein Maximum und sank bei längerem Erhitzen zuerst langsam, dann sehr rasch. Der Grund für die Abnahme besteht wahrscheinlich darin, daß nach gewisser Zeit unter der Hitzeeinwirkung mehr Fruktose durch Karamelisierung verloren geht, als durch Isomerisierung aus Glukose gebildet wird.

Die entsprechenden Veränderungen bei den andern Gärsubstraten haben wir nicht genauer untersucht, da es sich dabei um größere analytische Arbeiten handeln würde. Doch ist wohl der Analogieschluß erlaubt, daß die adsorbierten Substrate unter Hitzeeinfluß ebenfalls in leichter oxydierbare Stoffe umgewandelt werden.

e) Die Bedeutung der nichtenzymatischen Gärung für die praktische Fermentation

Wir sehen aus unseren Versuchen, daß ein vollkommen normal verlaufender, praktischer Fermentationsprozeß sowohl auf Grund enzymatischer als auch rein chemischer Reaktionen zustande kommen kann; ferner können beiderlei Reaktionen beteiligt sein. Die äußeren Merkmale

des Prozesses werden dadurch nicht wesentlich verändert; dagegen können die Produkte im einen oder andern Fall nicht dieselben sein:

Während bei der Autolyse mit sehr großer Ausgeglichenheit alle Blattsubstanzen (ausgenommen eigentliche Gerüstsubstanzen wie Zellulose) verändert, teilweise abgebaut oder ganz eliminiert werden, kann die nichtenzymatische Oxydation nur solche Stoffe erfassen, die bereits die geeignete Hitzeumwandlung erfahren haben. Ein Tabak, der zum Beispiel einmal auf 110° erhitzt wurde, zeigt praktisch keine Enzymaktivität mehr. Er fermentiert trotzdem scheinbar normal. Diese Fermentation kann aber nach den in Figur 10 dargestellten Beobachtungen nur auf Kosten der Oxykarbonsäuren, der einfachen Kohlehydrate und der Pektinstoffe verlaufen. Die Eiweißstoffe müssen unverändert bleiben, da die Temperatur, die notwendig ist, um sie oxydierbar zu machen, nicht erreicht wurde.

Mit der Wärmevorbehandlung legt man also den Charakter der späteren Fermentation endgültig fest. Man kann wohl beim Fermentationsprozeß durch die Wahl von Temperatur und Wassergehalt die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen, jedoch in keiner Weise die Art der chemischen Umwandlungen. Das Studium der Tabakfermentation mit dem Ziel, das fermentierte Produkt zu verbessern, muß also unbedingt bei der Trocknung einsetzen, besonders wenn diese künstlich durchgeführt wird.

Die nichtenzymatische Oxydation ist ferner der Vorgang, der für die Übergärung, Überhitzung und Verkohlung verantwortlich ist.

Unsere Kurven für die einzelnen Gärsubstrate (Figur 10) verlaufen nach der entscheidenden Umbiegung ungefähr geradlinig; die Oxydationsgeschwindigkeit steigt also von dieser Stelle an ungefähr proportional mit der Temperatur der Vorerhitzung. Die Reaktionstemperatur war jedoch bei diesen Versuchen immer 40°. Berücksichtigen wir, daß bei der Übergärung Temperaturen über 75° nicht nur kurze Zeit, in Form einer Vorbehandlung, einwirken, sondern die Reaktionstemperaturen darstellen, so erkennen wir, daß die an einem übergärenden Stapel aufgenommenen Kurven viel steiler verlaufen müssen. Denn jede Steigerung der Reaktionstemperatur bewirkt neben der Beschleunigung der Bildung oxydierbarer Stoffe auch die beschleunigte Oxydation dieser Stoffe. Man versteht leicht, daß auf diese Weise bei mangelnder Wärmeabstrahlung rasch sehr hohe Temperaturen erreicht werden.

Die Auslösung dieser Übergärung kommt durch einen rasch verlaufenden enzymatischen Gärvorgang zustande. Zwar bremst sich dieser selbst, indem bei steigender Temperatur die Enzymaktivität sinkt. Trotzdem kann auf diesem Wege eine Temperatur von 75—80°, das heißt das Gebiet erreicht werden, wo der sich selbst beschleunigende nichtenzymatische Vorgang einsetzt.

Diese Überlegungen dürften weitgehend auch für die Übergärung bei Futterstöcken gültig sein.

5. Zusammenfassung

1. Es werden zwei Methoden angegeben, die erlauben, die Sauerstoffaufnahme des Tabaks manometrisch bei wählbarem Wassergehalt zu messen und so den Fermentationsvorgang zu verfolgen. Bei der einen Methode wird der Tabak in Dekalin aufgeschlämmt, das zur Einstellung des Wassergehaltes des Tabaks mit Wasser emulgiert werden kann. Vorteil der Methode: Sehr hohe Konstanz des Wassergehaltes. Nachteil: Unnatürliche Bedingungen für die Entwicklung von Mikroorganismen; sehr hohe Schüttelfrequenzen bei der Messung.

   Bei der zweiten Methode wird der Tabak in den Meßgefäßen aufgeschichtet und sein Wassergehalt durch miteingeschlossene wässerige Lösungen von bestimmtem Wasserdampfdruck reguliert. Vorteil der Methode: Natürliche Bedingungen für die Mikrobenentwicklung. Nachteil: Im Verlauf starker Gärungen steigt der Wassergehalt des Tabaks infolge der Vermehrung der löslichen Substanz.
2. Der mit Hilfe der zweiten Methode aufgenommene Gärverlauf erlaubt, autolytische und mikrobiologische Gärung zu unterscheiden. Als Grenzfeuchtigkeit, bei welcher die Tätigkeit der Mikroben noch als Gärung manifest wird, wurde 28 % gefunden.

   Da bei der praktischen Fermentation der Wassergehalt in der Regel unter 25 % liegt, kann die mikrobiologische Gärung dabei nicht von Bedeutung sein.
3. Einwirkung von Hitze vor der Fermentation kann die Gärgeschwindigkeit eines Tabaks nur bis auf zirka 30 % reduzieren. Nach stärkerer Erhitzung werden wieder höhere Gärgeschwindigkeiten festgestellt. Die Steigerung ist auf einen nichtenzymatischen, durch die Hitze verursachten Vorgang zurückzuführen. Während das Ausmaß der Enzymaktivierung bei einer bestimmten Temperatur feuchtigkeitsabhängig ist, wird der nichtenzymatische Vorgang durch Hitze allein verursacht.
4. Die Ursache des nichtenzymatischen Gärvorganges ist eine teilweise Umwandlung der Gärsubstrate in leichter oxydierbare Substanzen unter dem Einfluß der Hitze. Diese Umwandlung, die nur im adsorbierten Zustand möglich ist, tritt bei jedem Gärsubstrat oberhalb einer charakteristischen kritischen Temperatur auf.
5. Im Falle der Glukose besteht die durch die Hitze bewirkte Veränderung in einer teilweisen Isomerisierung in Fruktose, die durch kontaktaktivierten Sauerstoff oxydierbar ist.

Literaturverzeichnis

1. Bodnar und Barta, Ergebnisse der Enzymforschung **4** (1935), 274.
2. Frankenburg, W. G., Advances in Enzymology **6** (1946), 274.
3. Frey-Wyßling, A., Vierteljahrsschrift der Naturf. Ges. Zürich **88** (1943), 176.
4. Giovannozzi, M., La Fermentazione dei Tabacchi, Rom 1940.
5. Johnson, J., Journal of agr. Research **49** (1934), 137.
6. Fodor und Reifenberg, Z. für physiol. Ch. **162** (1926), 1.
7. Dixon, M., Manometric Methods, Cambridge 1943.
8. Willstätter und Stoll, Untersuchung über die Assimilation der Kohlensäure (1918), 174.
9. Wolgunow, G. P., State Inst. f. Tob. Invest. Krasnodar **87** (1932).
10. Jensen, H., Zentralblatt f. Bakteriol. II **21** (1907), 469.
    — Archiv f. Mikrobiol. **1** (1930), 365.
11. Schweizer, Gg. Mikrokosmos **36** (1943), 107.
12. Cohen, Med. v. d. Proefst. Vorstenl. Tabak **12** (1914).
13. Boekhout und Ott de Vries, Zentralblatt für Bakteriol. II **24** (1909), 496.
14. Bodnar und Villanyi, Biochem. Z. **169** (1926), 1.
15. Neuberg und Kobel, Biochem. Z. **229** (1930), 455.
16. Obabko, cit.: Chem. Abstracts **1942,** 1439.
17. Svirin, cit.: Chem. Abstracts **1941,** 7655.
18. Yamafuji, Fuji, Tomita, Biochem. Z. **304** (1940), 160; **306** (1940), 24; **307** (1940), 314; **315** (1943), 419; **317** (1944), 76.
19. Warburg, O., Biochem. Z. **102** (1924), 479.
    — Naturwissenschaften **1934,** 441.
20. Wolfrom, Lewis, Am. Soc. **50** (1928), 840.
21. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse Bd. II, 833.