

Ueber Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe. I.

Von

Prof. E. Salkowski.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 4. April 1889.)

In meiner Mittheilung über die antiseptischen Eigenschaften des Chloroformwassers¹⁾ habe ich bereits darauf hingewiesen, dass das Chloroformwasser u. A. ein vortreffliches Mittel sei, um Spuren von löslichen Fermenten (Enzymen) nachzuweisen, weil man die Mischungen, in denen das Stattfinden von Fermentationen nachgewiesen werden soll, beliebig lange stehen lassen kann, ohne durch Auftreten von Fäulnisserscheinungen gestört zu werden. Dasselbe gilt natürlich auch von Lösungen, die man auf ein zu fermentirendes Substrat einwirken lassen will.

Einen, wie mir scheint, nicht uninteressanten Beleg zu dieser Behauptung bilden Beobachtungen, welche ich hinsichtlich des Vorkommens löslicher Fermente in der Hefe gemacht habe, deren — soviel mir bekannt — noch nirgend Erwähnung gethan ist.

I. Die Zuckerbildung in der Hefe.

Den Ausgangspunkt meiner Untersuchungen über diesen Gegenstand bildete eine zufällige Beobachtung. Eine kleine Quantität amyllumhaltiger Presshefe hatte, mit etwa dem 6 fachen Gewicht Chloroformwasser (5 cbcm. Chloroform in 1 L. Wasser

¹⁾ Deutsche med. Wochenschr., 1888, No. 16.

durch starkes Schütteln gelöst) vermischt, mehrere Monate gestanden. Als ich nach dieser Zeit die klar über der Hefe stehende, ziemlich dunkel gefärbte Lösung untersuchte, nachdem dieselbe von der Hefe abgossen, dann durch Erwärmen und Durchleiten eines Luftstromes vom Chloroform befreit worden war, zeigte sie sich in beträchtlichem Grade zuckerhaltig: sie gab starke Oxydul-Ausscheidung bei Anstellung der Trommer'schen Probe, schwärzte sich beim Erhitzen mit Nylander'scher Wismuthlösung, zeigte mit frischer Hefe schnelle und starke Gährung. Da sich die von mir benutzte Hefe bei früheren Untersuchungen stets als zuckerfrei erwiesen hatte, so musste man den Zucker als bei der Digestion mit Chloroformwasser neu gebildet ansehen, vermuthlich durch einen fermentativen Process, und es lag in dieser Beobachtung möglicherweise der Schlüssel für die sog. Selbstgährung der Hefe, die Entwicklung von Alkohol und Kohlensäure aus der Hefe selbst. Es musste indessen doch auch die Möglichkeit im Auge behalten werden, dass sich der Zucker aus, der Hefe beigemischtem, Amylum gebildet hatte, und es war weiterhin auch nicht von der Hand zu weisen, dass sich der Zucker überhaupt nicht neu gebildet hatte, sondern nur sehr langsam extrahirt war.

Hierüber waren also genauere Versuche anzustellen, bei denen die Verwendung völlig amyllumfreier Hefe erwünscht war. Eine solche war im Handel nicht zu erhalten, wohl aber eine annähernd amyllumfreie. Die mikroskopische Untersuchung der besten im Handel befindlichen Presshefe ergab immer vereinzelte mit Jod sich blau färbende Amyllumkörnchen von Kartoffeln, häufig freilich so wenige, dass man mehrere Gesichtsfelder durchmustern musste, um ein oder einige Körnchen zu entdecken. Ausserdem fanden sich auch Gewebs-trümmer von Pflanzentheilen, herrührend von den bei der fabrikmässigen Herstellung der Presshefe angewendeten Materialien, die mit Jod bläuliche Färbung annehmen. Dementsprechend konnte auch stets oder fast stets makroskopisch mit Jod-Jodkaliumlösung Amylum nachgewiesen werden, jedoch mit Sicherheit nur auf dem Wege, dass eine Quantität Hefe

mit Wasser gekocht und der erkalteten Mischung Jodlösung hinzugesetzt wurde. Es machte sich dann eine mehr oder weniger deutliche, immer aber ziemlich schwache Blaufärbung der Mischung bemerkbar. Wurde die Presshefe direct mit Jodlösung übergossen, so färbte sie sich an der Oberfläche bräunlich-roth, nicht bläulich. Für die beabsichtigten Versuche konnte diese minimale Beimischung wohl als bedeutungslos angesehen und die Hefe unbedenklich verwendet werden. Im Folgenden ist diese Hefe als « amyllumfreie Hefe » bezeichnet worden. Amyllumhaltige Hefe ist hier als Hefe zweiter Qualität im Handel.

Die Digestion der Hefe mit Chloroformwasser geschah stets in Glasstöpselflaschen unter häufigem Umschütteln bei 37—39° C. Ausnahmslos wurde zwischen Hefe und Chloroformwasser das Verhältniss 1 : 10 gewählt, nachdem sich in einigen Versuchen gezeigt hatte, dass geringere Verhältnisse nicht ausreichten, um die Selbstgärung ganz zu verhüten. Auch bei diesem Verhältniss scheint anfangs die Selbstgärung nicht ganz ausgeschlossen zu sein, wenigstens ist in den Flaschen anfangs etwas Ueberdruck vorhanden. Durch Zusatz eines geringen Ueberschusses von Chloroform und etwa 2stündiges Stehen in der Kälte unter häufigem Umschütteln vor der Digestion lässt sich diese Unvollkommenheit beseitigen.

Fäulnisserscheinungen traten bei der Digestion niemals auf, wiewohl man in der Hefe bei sorgfältigem Suchen stets vereinzelte Bacterien — Bacillen — nachweisen kann. Ihre Anzahl war freilich in der frischen Hefe stets ganz minimal, mehr davon fand sich öfters in der einige Tage im Kühlen aufbewahrten Hefe. Gleichzeitig zeigte diese Hefe einen eigenthümlichen weinartigen oder obstartigen Geruch. Die Hefe wurde daher stets mikroskopisch untersucht und möglichst frisch angewendet.

Nach mehrtägigem, am Anfang 7—8-, in den späteren Versuchen nur 2—3tägigem Stehen wurden die Mischungen filtrirt. Durch wiederholtes Zurückgiessen gelang es stets, ein fast klares Filtrat zu erhalten. Die Filtration ging immer sehr langsam und wurde deshalb möglichst im Kalten aus-

geführt, sie nahm meistens einen Tag, auch noch mehr in Anspruch. Es war nicht möglich, die rückständige Hefe ganz auszuwaschen, meistens musste ich mich damit begnügen, so viel Filtrat zu erhalten, als Chloroformwasser angewendet worden war. In den Berechnungen wurden dann 10 cbcm. Filtrat = 1 gr. Hefe gesetzt. Dabei ist allerdings ein kleiner Fehler gemacht, es dürfte aber kaum möglich sein, ihn ganz zu vermeiden.

Ehe ich auf die einzelnen Versuche eingehe, welche zur Aufklärung der Sachlage angestellt wurden, mögen einige Bemerkungen über die Art des Nachweises und die Bestimmung des Zuckers Platz finden. — In den eigentlichen Versuchen erhoben sich Schwierigkeiten nach dieser Richtung nicht, wohl aber in den zahlreichen Controllversuchen, in denen es sich darum handelte, die Frage zu entscheiden, ob sich Spuren von Zucker gebildet hatten oder nicht. Es war in den Controllversuchen in jedem Falle nothwendig, die Chloroformwasserauszüge durch Eindampfen zu concentriren, da sie an sich für die Untersuchung zu verdünnt waren. Für den Zuckernachweis in diesen durch Abdampfen concentrirten Lösungen liegen die Verhältnisse ähnlich wie beim Harn: auch diese Lösungen enthalten störende Substanzen, welche den Nachweis sehr erschweren können.

Zur vorläufigen Orientirung diente meistens Erhitzen mit Fehling'scher Lösung. Hierbei trat oft dieselbe Erscheinung ein, wie beim Harn: Reduction ohne Ausscheidung von Oxydul, besonders dann, wenn das Eindampfen (auf dem Wasserbad) zu weit fortgesetzt und in Folge dessen Bräunung eingetreten war. Am besten fiel die Reaction in der Regel aus, wenn die zu prüfende Lösung mit dem halben Volumen Fehling'scher Lösung versetzt und dann gekocht wurde. Auffallender Weise führte die Reaction mit Natronlauge + Kupfersulfat, die beim Harn meiner Ansicht nach den Vorzug verdient, auch nicht weiter, ja es konnte sogar öfters damit keine Reaction mehr erhalten werden, wenn die Reaction mit Fehling'scher Lösung noch positiv ausfiel, d. h. Ausscheidung von Oxydul bewirkte. Es ist nun freilich die Frage

sehr berechtigt, ob nicht die Reduction ebenso viel resp. ebenso wenig beweist, wie die Ausscheidung von Oxydul. An sich ganz gewiss, man kann nicht einmal sagen, dass die Ausscheidung immer einem grösseren Gehalt an Zucker entspricht. Hier aber, wo es sich stets um gleichartige Flüssigkeiten handelt, die Bedingungen für die Lösung des Kupferoxydul immer ziemlich dieselben sind, wird die Ausscheidung von Oxydul allerdings zusammenfallen mit einer etwas grösseren Menge von Zucker, Nichtausscheidung mit Anwesenheit sehr kleiner Mengen, resp. Reduction durch andere Substanzen. Aus diesem Grunde habe ich daran festgehalten, nur die Ausscheidung als beweisend anzusehen. Dass die Ausscheidung beweisend ist, geht aus dem Umstand hervor, dass in diesem Falle die Gährungsprobe stets sicher positiv ausfiel. Im anderen Fall fiel die Gährungsprobe in der Regel negativ aus, einigemal aber doch auch positiv.

Die Reinheit der Reaction wird ferner öfters getrübt durch die Gegenwart von Hefegummi in den Lösungen. Es scheidet sich alsdann nach Zusatz von Fehling'scher Lösung eine beim Erwärmen zunehmende, feinflockige, weissliche Trübung aus, welche beim stärkeren Erhitzen gelb wird, indem sich das Kupferoxydul auf den gummihaltigen Flocken niederschlägt¹⁾.

Die quantitative Bestimmung geschah gewichtsanalytisch durch Wägen des beim Erwärmen mit Fehling'scher Lösung gebildeten Kupferoxydul als Oxyd. Die Bestimmung als Oxyd ist sicher weniger genau, als die Bestimmung in Form von Schwefelkupfer, die ich sonst in der Regel anwende; zur Lösung der vorliegenden Fragen schien sie mir aber genau genug und ich gab ihr den Vorzug, weil sie weit weniger umständlich ist. — Auch bei der quantitativen Bestimmung traten mitunter Schwierigkeiten auf. Aus, nach Ausweis der Gährungsprobe, sehr schwach zuckerhaltigen Lösungen war

¹⁾ Möglicherweise berührt diese Erscheinung auch auf der Gegenwart von Zwischenproducten; ich komme weiter unten noch auf diese Frage zurück.

mitunter beim Versuch der quantitativen Bestimmung gar kein Kupferoxydul zu erhalten, vermuthlich in Folge der zerstörenden Wirkung des Alkali auf den Zucker (in den qualitativen Proben machte sich diese naturgemäss nicht so stark geltend, weil die Quantität des Alkali geringer war). Sodann aber kam es auch öfters vor, dass das Kupferoxydul durch das Filter ging und die Bestimmung auf diesem Wege unausführbar wurde. Diese Schwierigkeit trat namentlich in den stark eingeengten Lösungen hervor. Dieses ist auch der Grund, warum häufig der Zucker direct in dem Chloroformwasserfiltrat bestimmt wurde. Dabei ist aber sorgfältig auf die vollständige Entfernung des Chloroforms zu achten, da dasselbe bekanntlich stark reducirt. Die Gegenwart von Resten desselben kann sehr bedeutende Fehler verursachen und die Austreibung desselben durch Erwärmen erfolgt selbst unter Zuhülfenahme eines Luftstroms nicht so leicht, wie man sich nach der Flüchtigkeit des Chloroforms vorstellen sollte. In den späteren Versuchen wurde zur Entfernung des Chloroforms meistens ein abgemessenes Volumen des ursprünglichen Filtrates ca. 10 Minuten im Kolben gekocht, erkalten gelassen, wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Das gewogene Kupferoxyd wurde öfters durch Auflösen in Salzsäure, Verdünnen und Zusatz von Rhodankalium auf Gehalt an Oxydul, durch Auflösen in Salpetersäure oder Salzsäure und Uebersättigen mit Ammoniak auf Gehalt an Erdphosphaten geprüft. Solche waren niemals, kleine Mengen von Kupferoxydul öfters vorhanden. Die Zuckerbestimmung ist in diesen Fällen also etwas zu niedrig ausgefallen. — Ich gehe nunmehr zur Mittheilung der einzelnen Versuche über.

Versuch I.

Es wurden gleichzeitig digerirt:

Mischung A. Amylumfreie Hefe (60 gr.) mit Chloroformwasser (600).

Mischung B. Dieselbe Hefe, jedoch vorher sterilisirt, mit Chloroformwasser (60 : 600). Zur Sterilisirung wurden 60 gr. Hefe in einem Becherglas abgewogen, dasselbe dann 1½ Stunden im Dampftopf (strömender Dampf) erhitzt, die erkaltete Hefe mit dem abgemessenen Volumen Chloroformwasser in die Flasche gespült.

Mischung C. Amylumhaltige Hefe mit Chloroformwasser (60 : 600).

Mischung D. Dieselbe Hefe, jedoch vorher sterilisirt mit Chloroformwasser (60 : 600).

Mischung E. Amylum mit Chloroformwasser (60 : 600).

Nach Stägiger Digestion wurde filtrirt, aus Proben des Filtrates das Chloroform ausgetrieben. A und C gaben beim Erhitzen mit Fehling'scher Lösung rothes Kupferoxydul, B, D und E verhielten sich negativ¹⁾. A und C gaben Gährung mit Hefe, B, D und E nicht. Die gesammten Filtrate von B, D und E wurden, jedes für sich, eingedampft, mit Alkohol ausgezogen, die alkoholische Lösung verdunstet, der Rückstand zu 50 cbcm. gelöst: auch in diesen Lösungen war Zucker nicht nachweisbar. — Eine eingehendere Untersuchung der aus A und C stammenden Filtrate musste aus äusseren Gründen unterbleiben.

Versuch II.

Es wurden gleichzeitig digerirt:

Mischung A. 125 gr. amyllumfreie Hefe mit 1250 cbcm. Chloroformwasser.

Mischung B. 125 gr. amyllumhaltige Hefe mit 1250 cbcm. Chloroformwasser.

Nach Stägiger Digestion wurde filtrirt, beide Filtrate erwiesen sich nach Entfernung des Chloroforms zuckerhaltig. Auffällig war, dass B constant rothes Kupferoxydul gab, A dagegen schmutzig-gelbes Kupferoxydulhydrat.

Je 1200 cbcm. wurden auf 200 cbcm. eingedampft, in je 5 cbcm. der Zucker bestimmt.

5 cbcm. von A gaben 0,083 gr. CuO,

5 » » B » 0,080 » CuO.

Daraus berechnet sich für die ganze angewendete Quantität Hefe bei A 1,57 gr. Zucker, bei B 1,51 gr., unter der Annahme, dass das Reductionsvermögen mit dem des Traubenzuckers übereinstimmt.

Ein Theil der concentrirten Lösung diente zur Darstellung des Phenylhydrazinderivates. Beim Erhitzen mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat (1 : 2) auf dem Wasserbad schied sich im Verlauf einer knappen halben Stunde das Phenylhydrazinderivat aus. Nach einmaligem Umkrystallisiren aus heissem Alkohol resp. Eingiessen der alkoholischen Lösung in Wasser und Fortkochen des Alkohols nach E. Fischer erschienen die Verbindungen homogen, schmolzen aber weit niedriger (190—192), als das Phenylglucosazon resp. Phenylävuulosazon.

¹⁾ Dabei ist abgesehen von einer geringen, durch HCl und KCNS nachweisbaren Reduction.

die von vorneherein am wahrscheinlichsten waren. Die Darstellung eines Derivates vom Schmelzpt. 204° gelang dagegen auf folgendem Wege.

Ein Theil der concentrirten bräunlich gefärbten Lösung wurde durch Behandlung mit Knochenkohle einigermaßen entfärbt, dann mit dem 5fachen Vol. Alkohol absolut gefällt, filtrirt, das Filtrat verdunstet, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat erwärmt. — Die nach einer knappen halben Stunde ausgeschiedene Phenylhydrazin-Verbindung zeigte noch nicht den richtigen Schmelzpunkt. Sie wurde daher auf dem Filter nach dem Trocknen mit einer kleinen Quantität heissem Alkohol behandelt, so dass etwa die Hälfte ungelöst blieb, mit kaltem Alkohol nachgewaschen, dann auf's Neue mit heissem Alkohol behandelt.

Diese zweite alkoholische Lösung wurde stark mit Wasser verdünnt, einige Zeit im Sieden erhalten, unter Entweichen des Alkohols schied sich jetzt ein citronengelber, krystallinischer Niederschlag aus, der auf dem Filter gesammelt, gewaschen, getrocknet, den Schmelzpunkt $204-205$ zeigte, in Uebereinstimmung mit dem Phenylglucosazon oder Phenyllävulosazon. Auch aus der ersten alkoholischen Lösung konnte durch zweimaliges Eingiessen in Wasser eine Verbindung von sehr annähernd richtigem Schmelzpunkt ($203-204$) erhalten werden¹⁾. — Die Erscheinungen waren für A und B dieselben.

Die concentrirte Lösung gab starke Gährung mit Hefe, indessen zeigte die Flüssigkeit auch nach mehrtägiger Gährung noch reducirende Eigenschaften, welche möglicherweise auf unvollständige Vergährung des Zuckers zu beziehen sind.

Versuch III.

Es wurden gleichzeitig digerirt:

Mischung A. 125 gr. amylnfreie Hefe + 1250 ccm. Chloroformwasser.

A. 125 gr. amylnhaltige Hefe + 1250 ccm. Chloroformwasser.

Nach 7tägiger Digestion filtrirt.

Ein Theil der Lösung wurde nach Entfernung des Chloroforms zur Bestimmung der Reduction und Kohlensäure bei der Gährung verwendet.

10 ccm. von A	gaben	0,0408	und	0,0424,	im Mittel	0,0416	CuO,		
10	»	B	»	0,040	»	0,0394,	»	0,0397	CuO.

¹⁾ In den späteren Versuchen wurden die Phenylhydrazinderivate vom richtigen Schmelzpunkt mit geringerer Mühe erhalten, es ist möglich, dass das in den ersten Versuchen angewandte Phenylhydrazin-Präparat nicht ganz rein war und dieser Umstand die Schwierigkeiten verursachte.

Hieraus berechnet sich für A ein Procentgehalt an Zucker = 0,189, für B = 0,180, oder es sind aus den angewendeten 125 gr. Hefe gebildet bei A 2,36 gr., bei B 2,25 gr. Die Quantität des Zuckers stimmt also in den beiden Versuchen sehr nahe überein.

In je 20 cbcm. von A einerseits, von B andererseits wurde die durch Gährung gebildete CO_2 bestimmt. Der dazu benutzte Apparat bestand aus einem Kölbchen, dessen Ableitungsrohr mit einem Barytwasser enthaltenden Absorptionsapparat verbunden war, der seinerseits gegen die Kohlensäure der Luft durch ein Kaliröhrchen geschützt war. Ein zweites Rohr ging durch den Kautschukstopfen des Kölbchens bis unter das Niveau der Flüssigkeit, es war oberhalb des Stopfens in eine Spitze ausgezogen und zugeschmolzen. In das Kölbchen wurden 20 cbcm. des chloroformfreien Filtrates und etwa 0,5 gr. Hefe gebracht. Nachdem der Apparat 45 Stunden bei 35° gestanden hatte, wurde die ausgezogene Spitze abgebrochen, das Kölbchen erhitzt und ein langsamer Luftstrom durchgesaugt, bis man annehmen konnte, dass alle Kohlensäure ausgetrieben und von dem (chlorbaryumhaltigen) Barytwasser absorbiert sei. Der Gehalt des Barytwassers wurde vor der Gährung und nach der Gährung bestimmt. Zum Titriren diente Oxalsäure, von welcher 10 cbcm. = 10 Milligr. CO_2 . 20 cbcm. des angewendeten Barytwassers erforderten zur Neutralisirung 18,0 cbcm. Oxalsäure.

Der Absorptionsapparat war mit 25 cbcm. Barytwasser, entsprechend 22,5 Milligr. Oxalsäure beschickt; am Ende des Versuches wurde das Barytwasser in einen verschliessbaren Messcylinder entleert, nachgespült, auf 50 cbcm. aufgefüllt, nach dem Absetzen 25 cbcm. der klaren Flüssigkeit mit der Pipette entnommen und titirt. — Die Gährungsversuche mit A und B wurden mit 2 Apparaten gleichzeitig und unter denselben Bedingungen angestellt.

Die angewendeten 25 cbcm. erforderten nach der Gährung bei A zur Neutralisirung 2,0, bei B 1,8 cbcm. Oxalsäure, somit die 50 cbcm. = 25 cbcm. des ursprünglichen Barytwassers 4,0 resp. 3,6 cbcm. Oxalsäure. Da dasselbe vorher 22,5 cbcm. Oxalsäure erforderte, so sind bei A durch die Gährung 18,5 Milligr. CO_2 gebildet, bei B 18,9 Milligr. Hieraus berechnet sich unter der Annahme einer glatten Spaltung des Zuckers in Alkohol und CO_2 für A ein Gehalt an Zucker = 0,189%, für B = 0,193%.

Es ist selbstverständlich, dass bei Anwendung so dünner Lösungen resp. so kleiner Mengen das Resultat kein absolut entscheidendes sein kann, jedenfalls aber spricht der Versuch dafür, dass die Bestimmung nach Fehling und durch Gährung bei dem vorliegenden Zucker annähernd übereinstimmende Resultate ergibt. Das ist bekanntlich bei der Dextrose und annähernd auch bei der Lävulose¹⁾ der Fall. Es bedarf wohl noch einer Erklärung, dass ich diesen Gährungsversuch nicht mit

¹⁾ Tollens, Kohlehydrate in Ladenburg's Handwörterbuch der Chemie, Bd. VI.

einer durch Eindampfen concentrirten Lösung angestellt habe. Das ist aus dem Grunde nicht geschehen, weil in dieser concentrirten Lösung die Vergährung häufig unvollständig erfolgt, während in den verdünnten Lösungen der Zucker ganz vergährt. Dieses Verhalten konnte auch in dem vorliegenden Falle constatirt werden.

Je 1000 cbcm. des Filtrates wurden eingedampft, mit Alkohol gefällt¹⁾, der alkoholische Auszug verdunstet, der Rückstand in ungefähr 100 cbcm. Wasser gelöst, die stark gefärbte Lösung mit bas. Bleiacetat versetzt. Die von dem sehr geringen Niederschlage abfiltrirte Flüssigkeit wurde durch Schwefelwasserstoff entbleit, filtrirt und die immer noch stark gefärbte Lösung durch Behandlung mit Kohle einigermassen entfärbt: die so erhaltenen Lösungen erwiesen sich linksdrehend (= 0,9 Theilstriche des Soleil-Ventzke'schen Apparates), gaben starke Zuckerreactionen und schnelle Gährung mit Hefe, jedoch konnte vollständige Vergährung nicht erreicht werden.

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass bei der Autodigestion der Hefe eine gährungsfähige linksdrehende Zuckerart entsteht, deren Phenylhydrazinderivat mit dem Phenyllävulosazon (resp. Phenylglucosazon) übereinstimmt; sie haben ferner gezeigt, dass das Material zur Bildung dieses Zuckers von der Hefe selbst geliefert wird und dass dieser Process ein fermentativer ist, da er an sterilisirter Hefe nicht stattfindet. Der Annahme, dass auch das Amylum ein Material für die Zuckerbildung darstellen könne, sind die bisherigen Versuche nicht günstig gewesen.

Indessen lassen sich gegen die Verwerthung der Versuche nach dieser Richtung einige Einwendungen erheben. Es ist in diesen Versuchen amyllumfreie und amyllumhaltige Hefe unter möglichst gleichmässigen Bedingungen gehalten worden, um aus dem etwaigen Plus an Zucker auf die Gegenwart eines löslichen, auf Amylum saccharificirend wirkenden Fermentes zu schliessen. Gegen die Beweiskraft dieser Versuchsanordnung lassen sich begründete Bedenken erheben: 1. der Wassergehalt beider Hefesorten ist möglicherweise beträchtlich verschieden, während er in den Versuchen stillschweigend

¹⁾ Bei der Fällung mit Alkohol geht stets etwas Zucker verloren; die Niederschläge, in Wasser gelöst, geben immer positive Fehling'sche Reaction.

gleichgesetzt ist; 2. die amyllumhaltige Hefe repräsentirt in demselben Gewicht jedenfalls ein geringeres Gewicht an Hefe, da sie ja zu einem, wenn auch nur sehr kleinen Theil aus Amyllum besteht; 3. die Versuche gehen von der Annahme aus, dass in den beiden Hefearten eine gleiche Quantität desjenigen Fermentes enthalten sei, welches auf die Bestandtheile der Hefe selbst saccharificirend wirkt — eine Annahme, die nicht nothwendig richtig zu sein braucht. Richtiger war es offenbar, ein und dieselbe Hefe zu benutzen und derselben in der einen Mischung Amyllum hinzuzusetzen, in der anderen nicht. Gleichzeitig sollte dieser Versuch dazu dienen, nochmals die Thatsache zu erhärten, dass es sich wirklich um eine Fermentwirkung handelt.

Versuch IV.

Eine Quantität Hefe, welche sich bei der Untersuchung als fast amyllumfrei erwiesen hatte, wurde gleichmässig gemischt und 4 Antheile von je 50 gr. abgewogen, 2 derselben in Bechergläser gebracht und diese $1\frac{1}{2}$ Stunden im strömenden Dampf erhitzt, dann erkalten gelassen. Sämmtliche Antheile wurden nun mit je 500 ccm. Chloroformwasser in Glasstöpselflaschen gespült, in 2 Flaschen ausserdem noch 10 gr. Amyllum eingeschüttet. Die Mischungen waren somit:

- A 50 gr. Hefe + 500 Chloroformwasser,
- B 50 » » sterilisirt + 500 Chloroformwasser,
- C 50 » » + 500 Chloroformwasser + 10 gr. Amyllum,
- D 50 » » sterilisirt + 500 Chloroformwasser + 10 gr. Amyllum.

Nach 7tägigem Verweilen im Wärmeschrank, dessen Temperatur diesesmal nur $36-37^{\circ}$ betrug, wurden die Mischungen filtrirt. Nach dem Austreiben des Chloroforms reducirten A und C die Fehling'sche Lösung stark, B nicht, dagegen zeigte D diesesmal eine Spur Oxydul-Ausscheidung, wenn auch minimal gegenüber A und C.

Je 10 ccm. von A und C dienten zur Feststellung des Reductionsvermögens. Leider gelang es diesesmal nicht, klare Filtrate zu erhalten, das Kupferoxydul ging zum Theil durch das Filter. Es gelang erst auf einem Umwege: Die ge-

kochten Mischungen (mit Fehling'scher Lösung) wurden zuerst mit Salzsäure angesäuert, dann mit Natronlauge alkalisiert und erwärmt; nach einigem Umrühren erwies sich das Kupferoxydul filtrirbar. Es wurden so erhalten aus 10 cbcm. von A 0,0564 Kupferoxydul, aus 10 cbcm. von C 0,0460 Kupferoxydul. In der amyllumhaltigen Mischung hatte sich also erheblich weniger Zucker gebildet: die ganze Zuckerquantität berechnet sich für A zu 1,278, für B zu 1,043 gr. Der ganze übrige Rest der Filtrate von A und C wurde eingedampft, mit Alkohol gefällt, der Alkoholauszug verdunstet, in Wasser aufgenommen (ca. 50 cbcm.) und 24 Stunden mit Kohle stehen gelassen. Die Filtrate erwiesen sich linksdrehend, gährungsfähig, reducirend.

Weiterhin wurde in diesem Falle noch versucht, ob sich durch erneute Digestion der rückständigen Hefe noch Zucker erhalten lasse.

Die auf dem Filter restingende Hefe wurde mit 500 cbcm. Chloroformwasser in eine Flasche gespült und 35 Tage lang weiter digerirt, dann filtrirt. Das Filtrat, auf 100 cbcm. eingedampft, zeigte schwache Zuckerreaction und schwache Gährung. 10 cbcm. gaben 0,0324 gr. CuO, entsprechend im Ganzen 0,14 gr. Zucker. — Die auf dem Filter restingende Hefe wurde nochmals mit Chloroformwasser digerirt und zwar diesmal 42 Tage lang, dann filtrirt, das Filtrat auf 50 cbcm. eingedampft. Zucker war in dieser Flüssigkeit nicht mehr wahrzunehmen. 10 cbcm. der Lösung gaben beim Erhitzen mit 10 cbcm. Fehling'scher Lösung einige weissliche Flöckchen, welche sich bei andauerndem Kochen röthlich färbten. CuO wurde erhalten 0,0066 gr., für die ganze Flüssigkeit also 0,033 gr. = 0,015 gr. Zucker.

Der bei dieser erschöpfenden Digestion erhaltene Rückstand gab bei 1½ stündigem Kochen mit 5procentiger Schwefelsäure eine Lösung, welche starke Zuckerreaction zeigte, und nach Entfernung der Schwefelsäure durch Baryt und Eindampfen auch lebhafte Gährung mit Hefe.

Da sich somit auch in diesem Versuche kein Plus von Zucker in den amyllumhaltigen Mischungen ergeben hatte, sah ich von weiteren Versuchen nach diesen Richtungen ab, um so mehr, als auch die sonst an den amyllumhaltigen Mischungen gemachten Beobachtungen gegen die Existenz eines Amyllum saccharificirenden Fermentes sprachen, nämlich: 1. der Umstand, dass auch aus den amyllumhaltigen Mischungen linksdrehender Zucker resultirte, 2. der Umstand, dass auch die Spuren von Stärke, die in der sog. amyllumfreien Hefe vorhanden waren, sich nach der Digestion vorfanden — ob ebenso viel, steht freilich dahin —, eine Umwandlung derselben also nicht nachweisbar war.

Da es sich für mich zunächst nur darum handelte, festzustellen, ob unter den gewählten Versuchsbedingungen die Zuckerbildung aus Bestandtheilen der Hefe selbst erfolgt, oder aus beigemengtem Amylum, diese Frage aber durch die bisherigen Versuche entschieden ist, so habe ich weitere Versuche über die etwaige Existenz eines amyumlösenden Fermentes, die ich noch nicht für ganz ausgeschlossen halten möchte, nicht angestellt. Dagegen schienen mir noch weitere Versuche nothwendig, um mit Bestimmtheit zu erweisen, dass es sich in den bisher berichteten Versuchen in der That um eine Bildung von Zucker handelt, so sehr wahrscheinlich dieses auch war, und nicht um eine langsame Auslaugung schon präformirten Zuckers, sowie ferner nicht etwa um eine Inversion von dem Handelsproduct vielleicht beigemischtem Rohrzucker. Diese Versuche sollten gleichzeitig dazu dienen, die Frage über den zeitlichen Verlauf der Zuckerbildung, sowie über die Nebenproducte dabei zu beantworten. Zunächst versuchte ich, etwa vorhandenen Zucker durch Gährung zu entfernen.

Versuch V.

125 gr. Presshefe wurden mit 1250 ccm. Wasser auf 24 Stunden in den Wärmeschrank gestellt. Es trat ziemlich lebhaft Gährung ein, die Mischung roch nach 24 Stunden unangenehm, etwas faulig. Sie wurde filtrirt, die Filtration nahm 24 Stunden in Anspruch.

Ein Theil des Filtrates wurde destillirt. Im Destillat war Alkohol nachweisbar (Reduction von Chromsäure zu Chromoxyd unter Auftreten von Aldehydgeruch, Jodoformbildung), es gab ferner starke Reduction von $\text{AgNO}_3 + \text{NH}_3 + \text{NaHO}$ (Aldehyd? Furfurol?), enthielt kein Aceton. Der Destillationsrückstand, sowie die übrigen Filtrate wurden eingedampft und mit Alkohol gefällt, von dem nicht erheblichen zähen Niederschlag (Pepton und etwas Gummi) abfiltrirt und verdunstet. Weder die Lösung des Verdampfungsrückstandes, noch die Lösung der Alkoholfällung gab Zuckerreaction.

Die rückständige Hefe wurde nun mit 1250 ccm. Chloroformwasser 7 Tage bei $37-39^\circ$ digerirt, filtrirt. Das Filtrat gab nach Entfernung des Chloroforms direct keine Zucker-

reaction. Es wurde auf dem Wasserbad eingedampft, mit Alkohol extrahirt, der Alkoholauszug verdunstet, auf 50 cbcm. gebracht, hiermit Reaction angestellt. Beim Erhitzen kleiner Proben mit dem halben Volum Fehling'scher Lösung trat Ausscheidung von gelbem Oxydulhydrat ein, ebenso positive Reaction mit Nylander'scher Wismuthlösung. Die Gährungsprobe 2 mal angestellt fiel dagegen negativ aus. Es ist also Zucker nicht bestimmt nachweisbar. Beziehen wir aber auch die angegebene Reaction auf Zucker, so zeigt die Bestimmung mit Fehling'scher Lösung, dass es sich nur um äusserst geringfügige Mengen handeln kann. Aus 5 cbcm. jener Lösung wurden 0,0264 Kupferoxyd erhalten, somit aus 50 cbcm. 0,264 gr. Dieses würde etwa 0,12 gr. Zucker für 125 gr. Hefe entsprechen, also eine verschwindend kleine Quantität.

Aus solcher Hefe, welche den Process der Selbstgährung durchgemacht hat, ist somit Zucker durch Digestion nicht mehr zu erhalten.

Demnächst versuchte ich, den etwa präformirt vorhandenen Zucker mit Chloroformwasser auszuziehen.

Versuch VI.

125 gr. Presshefe wurden 48 Stunden bei 37—39° mit 1250 cbcm. Chloroformwasser digerirt, dann filtrirt. Das gesammte Filtrat bis auf ca. 50 cbcm. eingedampft und mit etwa 200 cbcm. 95procentigem Alkohol gefällt, filtrirt, verdunstet, die Fällung mit Alkohol noch einmal wiederholt, der Verdunstungsrückstand auf 100 cbcm. gebracht. Zuckerreactionen positiv, Gährung tritt schon nach einer halben Stunde ein, nach 48 Stunden bewirkt die ausgegohrene Lösung noch ganz schwache Reduction mit Fehling'scher Lösung, jedoch keine Oxydulausscheidung. Aus 2 cbcm. wurde 0,064 Kupferoxydul erhalten, daraus ergaben sich für 100 cbcm. 3,20 Kupferoxyd = 1,45 gr. Zucker.

Die auf dem Filter gebliebene Hefe wurde auf's Neue mit 1250 cbcm. Chloroformwasser digerirt, dieses Mal 7 Tage, filtrirt, das Filtrat eingedampft, mit Alkohol gefällt, der Alko-

holauszug verdunstet und in Wasser zu 100 cbcm. gelöst. 5 cbcm. dieser Lösung gaben 0,0716 resp. 0,0726 cbcm., somit enthielt die Lösung 0,65 gr. bezw. $\frac{1}{2}\%$ Zucker.

Die Zuckerreactionen verliefen in dieser Lösung ganz besonders schön, weil die störenden Substanzen durch die vorangegangene Digestion entfernt waren; sie mögen ausnahmsweise hier speciell angeführt werden:

1. Mit $\frac{1}{2}$ Vol. Fehling'scher Lösung: starke gelbrothe Oxydulausscheidung.
2. Mit Nylander's Wismuthlösung: 0,5 cbcm. auf 5 cbcm. intensive Schwarzfärbung, bei nachträglichem Säurezusatz Caramelgeruch.
3. Mit Indigolösung: das bekannte charakteristische Verhalten.
4. Mit $\text{AgNO}_3 + \text{NH}_3 + \text{NaHO}$: Silberspiegel.
5. Mit Kalihydrat in Substanz erwärmt: stürmische Reaction, bei Ansäuern Caramelgeruch.
6. Mit Hefe: schnelle Gärung nach ca. 1 Stunde; nach 48 Stunden noch geringe Reduction, keine Oxydulausscheidung.
7. Eine Quantität durch Schütteln mit sehr wirksamer Knochenkohle fast entfärbt, polarisirt links ca. 0,8 Theilstriche des Soleil-Ventzkeschen Apparates. Die Kohle absorbirte nur sehr wenig Zucker. 5 cbcm. der entfärbten Lösung gab 0,0674 CuO gegenüber 0,0721 aus der nicht entfärbten. Dieses ist jedoch eine Ausnahme, in der Regel bleibt weit mehr in der Kohle absorhirt, namentlich aus unreinen Lösungen.
8. Die entfärbte Lösung (ca. 30 cbcm.) mit 1 gr. salzsaurem Phenylhydrazin und 2 gr. Natriumacetat auf dem Wasserbad erwärmt: nach $\frac{1}{2}$ Stunde krystallinische Ausscheidung. Diese abfiltrirt, in Alkohol gelöst, durch Eingiessen in Wasser zur Ausscheidung gebracht. Schmp. der gut krystallisirten Verbindung 2040.

Dieser Versuch zeigt, dass auch aus solcher Hefe, von welcher man mit aller Sicherheit annehmen kann, dass sie zuckerfrei ist, bei der Digestion mit Chloroformwasser Zucker zu erhalten ist. Auch von Rohrzucker musste die einmal digerirte Hefe mit Sicherheit frei sein, da Hefe nach meinen früheren Erfahrungen bei Digestion mit chloroformhaltigen Rohrzuckerlösungen das Mehrfache ihres Gewichtes an Rohrzucker innerhalb 48 Stunden vollständig invertirt.

Das gleiche Resultat hatte ein zweiter Versuch, bei welchem die erste Extraction möglichst abgekürzt wurde, um die Zuckerbildung während der Extraction möglichst herabzudrücken.

Versuch VII.

2,3162 gr. einer Presshefe gaben 0,6842 gr. Trockenrückstand = 29,5%. — 100 gr. dieser Hefe mit 1000 ccm. Chloroformwasser gut durchgeschüttelt, dann sofort filtrirt. Die Filtration nahm 24 Stunden in Anspruch. Das ganze Filtrat wurde auf dem Wasserbad auf 100 ccm. eingedampft. Diese Lösung gab beweisende Zuckerreaction, auch positive Gährungsprobe. Die Fehling'sche Zuckerbestimmung verlief nicht fehlerfrei. 5 ccm. gaben 0,031 CuO, somit enthielten die 100 ccm., aus 100 gr. Hefe stammend, 0,28 gr. Zucker.

Die rückständige Hefe wurde wiederum mit 1000 ccm. Chloroformwasser 8 Tage digerirt, dann filtrirt, das Filtrat auf 100 ccm. eingedampft. 2 ccm. der Lösung gaben 0,0662 resp. 0,0632 CuO, Mittel 0,0646 CuO. Die Bestimmung war nur auf dem in Versuch IV angegebenen Umwege möglich. Zuckergehalt der Lösung somit 1,46%. — Die durch Alkohol-fällung gereinigte Lösung gab beim Erwärmen mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat in einer halben Stunde krystallinisches Phenylhydrazinderivat; Schmp. desselben nach der Reinigung 205°.

Der bei der Digestion gebliebene Heferückstand nochmals mit 1000 ccm. Chloroformwasser 10 Tage digerirt. Filtrat auf 100 eingedampft. 10 ccm. dieser Lösung gaben 0,0412 resp. 0,0402 CuO = 0,184 gr. Zucker in 100 ccm.

Die Zuckerbildung hört also bei mehrmaliger Digestion schliesslich fast vollständig auf.

Einige weitere Versuche dienten zur Feststellung besonderer Verhältnisse.

Versuch VIII.

2,0412 gr. einer Presshefe gaben 0,5818 gr. Trockenrückstand = 28,0%. Von dieser Hefe werden 5 Proben zu je 100 gr. abgewogen.

A wird mit 1 Liter siedendem Wasser übergossen; dann noch $\frac{3}{4}$ Stunden auf dem Wasserbad erhitzt und filtrirt.

B wird im Kolben 1 Stunde lang mit 1 Liter Alkohol von 50% im Wasserbad erhitzt und filtrirt.

C wird sterilisirt, dann mit 1000 Chloroformwasser übergossen, dann in den Wärmeschrank gebracht.

D wird direct mit Chloroformwasser (1000) übergossen und in den Wärmeschrank gebracht.

E wird direct übergossen und bei Zimmertemperatur 66 Stunden stehen gelassen.

Der Auszug A wurde auf dem Wasserbad eingedampft, auf 100 ccm. aufgefüllt, filtrirt. Das Filtrat war nach mehrfachem Zurückgiessen fast klar, mässig gefärbt. Es gab Peptonreaction, keine Zuckerreaction (enthielt ausserdem Gummi, worüber später berichtet werden soll).

Der Auszug B wurde ebenso behandelt, die Peptonreaction war schwächer, sonst das Verhalten dasselbe.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die Hefe keinen Zucker enthält (auch nicht Rohrzucker, sonst hätte bei Zusatz von Natronlauge + Kupfersulfat tiefblaue Färbung entstehen müssen), noch auch sich Zucker bei der Einwirkung von siedendem Wasser oder siedendem Alkohol aus der Hefe bildet.

C, D und E wurden nach 66 Stunden filtrirt, je 50 ccm. des Filtrates abgenommen und vom Chloroform befreit. In 10 ccm. von C war beim Kochen mit Fehling'scher Lösung im Ueberschuss keine Ausscheidung zu erhalten, 10 ccm. von D lieferten 0,0532 resp. 0,0514 CuO, Mittel 0,0523 CuO; 10 ccm. von E lieferten 0,0394 CuO. Dies entspricht für 100 gr. Hefe bei D 2,372 gr. Zucker, bei E 1,79 gr. Zucker. Somit findet die Zuckerbildung auch bei Zimmertemperatur statt, bleibt jedoch etwas geringer. Ferner zeigt sich aber, dass es gar nicht so langer Digestion bedarf, wie sie in den früheren Versuchen angewendet worden ist, denn die erhaltene Zuckermenge ist grösser — auf Trockensubstanz bezogen 8,47% — wie in allen vorhergehenden Versuchen, bis auf einen. Es scheint danach fast, als ob bei längerer Digestion ein Theil des Zuckers wieder verloren geht.

Der Rest der Lösungen, je 950 cbcm., wurde auf je 95 cbcm. eingedampft. C gab nunmehr ziemlich starke Reduction, jedoch keine Oxydulausscheidung und keine Gährung. Ebenso wenig gelang die Phenylhydrazinreaction in der durch Fällung mit Alkohol gereinigten Lösung: es schieden sich nur Spuren eines gelblichen Niederschlages aus, beim Versuch der Reinigung verschwand jedoch die geringe Quantität unter den Händen.

Versuch IX.

2,169 gr. Presshefe (amylumfrei) gaben 0,6024 Trockenrückstand = 27,7%. Von dieser Hefe einzelne Portionen abgewogen.

A 100 gr. mit 1000 cbcm. Chloroformwasser 66 Stunden digerirt.

B 100 gr. sterilisirt mit 1000 cbcm. Chloroformwasser 66 Stunden digerirt.

C 172 gr. mit 1720 cbcm. Chloroformwasser 66 Stunden digerirt, filtrirt.

D 100 gr. mit 1 Liter Wasser ausgekocht.

Ich führe an dieser Stelle nur die Zuckerbestimmung in A und B an. Die Auszüge von A und B wurden auf 100 cbcm. eingedampft. Aus 2 cbcm. von A wurden erhalten 0,0516 resp. 0,0536, im Mittel 0,0526 CuO = 1,72 gr. Zucker für 100 Hefe, bei B verlief die Bestimmung resultatlos.

Versuch X.

Von einer grösseren Quantität (amylumfreier) Presshefe werden

A 100 gr. mit 1000 Chloroformwasser 69 Stunden digerirt,

B 100 gr. sterilisirt, dann ebenso digerirt,

C 100 gr. mit Wasser der Selbstgährung überlassen,

D 50 gr. mit verdünnter Schwefelsäure gekocht.

Auch hier theile ich nur die Zuckerbestimmung in A und B mit. Die Auszüge wurden auf 100 cbcm. eingedampft.

2 chem. dieses Auszuges von A gaben $0,0938 \text{ CuO} = 2,13 \text{ gr.}$ Zucker für 100 Hefe. Bei B verlief die Bestimmung resultatlos.

Ueber die Quantität des Zuckers (berechnet unter der Annahme, dass das Reductionsvermögen ebenso gross sei, wie das des Traubenzuckers), giebt nachfolgende Tabelle Auskunft. Was die Berechnung auf die Trockensubstanz der Hefe betrifft, so ist den Versuchen VII, VIII und IX die an derselben Hefe ermittelte Trockensubstanz zu Grunde gelegt, in den anderen Versuchen in runder Zahl ein Gehalt an Trockensubstanz von 29% angenommen, was eher zu viel, als zu wenig ist (die anderen Bestimmungen hatten ergeben 29,5, 28,0, 27,7%).

Zucker gebildet in Grammen aus:

Nummer des Versuches.	Beschaffenheit der Hefe.	Dauer der Digestion.	100 gr. Hefe feucht.	100 gr. Hefe trocken.
II.	a) amyllumfrei	8 Tage	1,26	4,34
	b) amyllumhaltig	8 Tage	1,21	4,17
III.	a) amyllumfrei	7 Tage	1,89	6,52
	b) amyllumhaltig		1,80	6,21
IV.	a) amyllumfrei	7 Tage	2,556	8,81
	b) amyllumhaltig		2,086	7,19
VI.	amyllumfrei	9 Tage	1,68	5,79
VII.	amyllumfrei	8 Tage	1,84	6,24
VIII.	amyllumfrei	66 Stunden	2,37	8,47
IX.	amyllumfrei	66 Stunden	1,72	6,21
X.	amyllumfrei	69 Stunden	2,13	7,33
			Summa . .	71,28

Im Mittel aus 11 Einzelversuchen betrug somit die Quantität des gebildeten Zuckers 6,48% des Trockengewichts der Hefe, im Maximum 8,81¹⁾, im Minimum 4,17%. Die Quantität des Zuckers nimmt mit der Dauer der Digestion nicht zu, eher könnte man annehmen, dass sie bei einer 69 Stunden übersteigenden Dauer der Digestion wieder abnimmt, doch

¹⁾ In einer vorläufigen Mittheilung, Centralbl. f. d. med. Wiss., 1889, No. 13, bezeichnete ich als Maximum 8,47, die Zahl 8,81 ist dabei übersehen worden.

ist die Zahl der Einzelversuche zu gering, um dieses mit Bestimmtheit behaupten zu können.

Ich möchte an dieser Stelle noch mit einigen Worten auf die Natur des neugebildeten Zuckers eingehen. Die schnelle Bildung des Phenylhydrazinderivates, der Schmelzpunkt derselben, die Linksdrehung der Lösung, die nahe Uebereinstimmung zwischen dem Resultat der Bestimmung nach Fehling und durch Gährung sprechen dafür, dass der neugebildete Zucker Lävulose ist.

Endlich spricht für den Lävulose-Character des neugebildeten Zuckers noch der Umstand, dass die Lösungen desselben die Pettenkofer'sche Gallensäure-Reaction anscheinend besser geben, wie Traubenzucker, in Uebereinstimmung mit der Angabe von E. Külz¹⁾, dass die Lävulose resp. Saccharose zur Anstellung dieser Reaction geeigneter sei, wie die Dextrose. (Beiläufig bemerkt ist übrigens das verschiedene Verhalten von Dextrose und Lävulose in dieser Richtung sehr auffällig, seitdem wir durch Mylius²⁾ wissen, dass diese Reaction nur auf der Bildung von Furfurol aus dem Zucker beruht. Man muss danach annehmen, dass sich das Furfurol aus der Lävulose leichter bildet, wie aus der Dextrose.) Der vollständige Beweis für die Identität des bei der Digestion der Hefe gebildeten Zuckers mit der Lävulose wird aber erst dann als erbracht angesehen werden können, wenn es gelungen ist, den Zucker rein darzustellen und die bei der Lävulose stattfindenden Relationen zwischen Reduction, Polarisation und Gährung an diesem Zucker wiederzufinden. — Es bedarf daher wohl einiger Rechtfertigung, dass ich auf die Reindarstellung des Zuckers nicht grösseren Werth gelegt habe. Die Gründe sind folgende. Zunächst lag mir mehr daran, den Process der Zuckerbildung an sich und seinen Umfang festzustellen, die Natur des Zuckers stand für mich erst in zweiter Linie. Sie hatte erst dann Interesse, wenn der Nachweis erbracht war, dass sich Zucker bildet

¹⁾ Centralbl. f. d. med. Wiss., 1875, No. 31.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XI, S. 492.

und nicht ausgelaugt wird, dass er durch Fermentation entsteht, dass er aus Bestandtheilen der Hefezellen selbst entsteht, dass seine Menge nicht geringfügig ist. Erst wenn alles dieses feststand, hatte die Frage nach der Natur des Zuckers überhaupt Interesse. Die Reindarstellung des Zuckers ist bisher nicht ernstlich in Angriff genommen worden, weil die Aussichten für das Gelingen derselben zur Zeit zu gering sind. — Zunächst steht es zwar fest, dass die Lävulose krystallisirbar ist, allein sie krystallisirt thatsächlich sehr schwer und die Bedingungen für den Eintritt der Krystallisation sind wenig bekannt. Als wesentlich erschwerendes Moment für den Versuch der Reindarstellung kommt die geringe Concentration der Lösungen in Betracht. Da die (frische) Hefe mit dem 10fachen Gewicht Chloroformwasser digerirt wird, so erhält man auch im günstigsten Fall nur eine Lösung von etwa 2 p. M. Gehalt. Die Lösungen müssen also stark concentrirt werden und man muss erhebliche Mengen eindampfen. Das ist ohne grösseren Vacuum-Apparat nicht möglich, ein solcher steht mir aber nicht zur Verfügung.

Will man möglichst schnell gute Zuckerreactionen aus dem chloroformhaltigen Filtrat der digerirten Hefe erhalten, so thut man am besten, eine Quantität des bei möglichst niedriger Temperatur auf $\frac{1}{3}$ eingedampften Auszuges (zur Winterszeit habe ich mich des Ausfrierens bedient) mit einem möglichst geringen Ueberschuss von Bleiessig zu fällen, das Filtrat mit H_2S zu entbleien und den überschüssigen H_2S durch CO_2 zu entfernen. Die Lösung ist dann allerdings stets essigsäurehaltig. Man kann auch umgekehrt verfahren, das Filtrat direct mit bas. Bleiacetat fällen und hinterher einengen.

Eine Frage sei hier noch berührt, nämlich, ob die Digestionsflüssigkeit ausser Zucker noch Vorstufen desselben enthält. Dieses scheint in der That öfters der Fall zu sein. In den aus der sterilisirten Hefe erhaltenen Digestionsflüssigkeiten findet man stets Gummi, in den aus der frischen Hefe erhaltenen mitunter auch, mitunter aber auch nicht, sondern statt dessen Substanzen, welche mit dem Gummi zwar die Fäll-

barkeit durch alkalische Kupferlösung theilen, aber anscheinend gleichzeitig reducirend wirken, was das Hefegummi nicht thut. Diese Verhältnisse genauer zu eruiren, muss weiteren Versuchen überlassen bleiben.

II. Anderweitige Spaltungsvorgänge in der Hefe bei der Digestion.

Neben der Bildung von Zucker verlaufen in der Hefe bei der Digestion noch andere Processe, welche gleichfalls fermentativer Natur sind.

1. Jede digerirte Mischung enthält Leucin und Tyrosin, deren Darstellung und Erkennung so einfach ist, dass ich hierauf nicht weiter einzugehen brauche. Das Tyrosin scheidet sich in der Regel schon aus den eingedampften Lösungen direct in Form kreidig-weisser Massen ab, bezw. im Alkoholniederschlag, wenn man die eingedampften Lösungen sofort mit Alkohol fällt. Das Tyrosin schliesst Xanthinkörper ein, von denen es durch Silberfällungen leicht zu trennen ist. Das Leucin geht zum grössten Theil in die alkoholischen Auszüge über und scheidet sich beim Einengen derselben in Form von Häuten ab. Es ist schwer von den letzten Antheilen reducirender Substanz zu befreien, dies gelingt nur unter Aufopferung eines ansehnlichen Theiles des Materials durch wiederholtes Umkrystallisiren und Entfärben mit Kohle. — Auf die Mengen-Verhältnisse bin ich nicht näher eingegangen, da der Hauptzweck der Untersuchung die Berücksichtigung dieses Punktes nicht zuliess.

Auch die Bildung von Leucin und Tyrosin beruht auf einem Fermentvorgang. In den Versuchen, in denen sterilisirte Hefe mit Chloroformwasser digerirt wurde, waren höchstens Spuren von Leucin in den Auszügen nachweisbar. Ebenso wenig sind diese Körper in der angewendeten Hefe präformirt.

Zur genaueren Untersuchung hierauf wurden 500 gr. Presshefe mit 5 L. Wasser (in einzelnen Antheilen zu 100 resp. 200 gr.) 1 bis 1½ Stunden auf dem Wasserbad erhitzt, die Auszüge filtrirt und eingedampft. Beim Filtriren der ein-

gedickten Auszüge, das schwierig vor sich ging, jedoch ein klares Filtrat lieferte, blieb auf dem Filter eine schlammige Masse. Die mikroskopische Untersuchung derselben ergab Fetttröpfchen in grösserer Menge neben Hefezellen, welche die Filter passirt hatten. — Das Filtrat wurde mit Alkohol absol. gefällt. Der Niederschlag erwies sich als peptonhaltig (Albumosen waren nur in sehr geringer Menge vorhanden), das alkoholische Filtrat gab beim Verdunsten kleine Quantitäten von Leucin in Form von Häutchen auf der Oberfläche der Flüssigkeit. Es ist nicht gerade ausgeschlossen, dass auch das gefundene Pepton und Leucin nur zum kleinsten Theil wirklich präformirt war, zum grösseren erst durch die Einwirkung des siedenden Wassers entstanden war.

Es ist wohl anzunehmen, dass sich bei der Digestion der Hefe auch Pepton bildet, jedoch ist dieser Punkt nicht näher verfolgt worden.

Auf das Zugrundegehen eines Theiles des eiweissreichen Zelleninhaltes ist wohl auch die Aenderung des mikroskopischen Bildes zu beziehen, welches die digerirte Hefe gegenüber der frischen darbietet. Die digerirten Hefezellen erscheinen erheblich kleiner und gewissermassen weniger prall. Auf Zusatz wässriger Jod-Jodkaliumlösung färbt sich nur die im Centrum liegende Masse gelbbraun, während die frische Zelle bei Behandlung mit Jodlösung einen dicht an der Membran anliegenden gelbbraunen Saum aufweist.

2. Ferner findet man in den Auszügen der frisch digerirten Hefe beträchtliche Quantitäten von direct durch Silberlösung nach Zusatz von Ammoniak fällbaren Xanthinkörpern (der Kürze halber wird im Folgenden dafür öfters der Ausdruck Hypoxanthin gebraucht werden), in den Auszügen der sterilisirten und dann digerirten dagegen nicht.

Von Versuch IX wurden 10 chem. des auf 100 chem. eingedampften Auszugs von A mit Ammoniak und Magnesiainischung versetzt, mit Wasser verdünnt, von den reichlich ausgeschiedenen Phosphaten abfiltrirt und mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt: es entstand ein reichlicher Nieder-

schlag. Der Auszug B aus der sterilisirten Hefe gab, ebenso behandelt, auch nicht die geringste Trübung mit Silberlösung, ja blieb auch bei tagelangem Stehen ganz klar, färbte sich nur etwas dunkler.

Um die Quantität der in den Auszügen von A enthaltenen Xanthinkörper annähernd zu bestimmen, erschien es mir am einfachsten, den Silbergehalt des Niederschlages nach der Volhard'schen Methode mit Rhodanammon zu bestimmen. Voraussetzung ist dabei natürlich, dass der Niederschlag nicht allein frei ist von überschüssigem Silber, was sich durch Waschen leicht erreichen lässt, sondern dass er auch keine Spur von Chloriden mehr enthält, welche bei der nachträglichen Auflösung in Salpetersäure zur Bildung von Chlor Silber, somit zu Verlust von Silber Veranlassung geben würden. Durch anhaltendes Waschen mit lauwarmem Wasser gelingt es schliesslich, wenn die Quantität des Niederschlages nicht zu gross ist, zu einem Punkt zu gelangen, in dem das Waschwasser absolut frei ist von Chloriden. Minimale Spuren von Chloriden bleiben auch dann noch im Niederschlag: quantitativ kommen sie aber wenig in Betracht. Der Silberniederschlag wird zum Zweck der Silberbestimmung verascht, er kann aber auch allenfalls direct in Salpetersäure gelöst werden.

Zur Bestimmung diente eine Rhodanlösung, von der 1 cbem. 8,69 Milligr. metall. Silber entsprach. Der Silberniederschlag aus den obigen 10 cbem. aus A erforderte 5,45 cbem. Rhodanlösung = 54,5 cbem. oder 0,4736 Ag für 100 gr. Hefe.

Der Ausfall der Prüfung mit Silberlösung könnte leicht zu dem Schluss verführen, dass nur in dem Auszuge der frisch digerirten Hefe Xanthinkörper enthalten seien, in dem aus der sterilisirten Hefe dagegen nicht. So naheliegend dieser Schluss ist, so unrichtig ist er trotzdem. Auch dieser Auszug enthält Hypoxanthin, jedoch in einer latenten Form.

Schon vor einer langen Reihe von Jahren¹⁾ habe ich darauf aufmerksam gemacht, dass der Leim die Fähigkeit

¹⁾ Pflüger's Arch., Bd. V, S. 95 (1871).

hat, die Bildung eines Silberniederschlags in Hypoxanthinlösungen zu verhindern, und nach zahlreichen Erfahrungen muss ich jetzt sagen, dass in stärkerem oder geringerem Grade alle wässrigen Auszüge der Gewebe derartige störende Substanzen enthalten. So bekommt man z. B. auch aus dem käuflichen Fleischextract weit mehr Hypoxanthin, wenn man es vorher mit Säuren, namentlich Salpetersäure behandelt, als wenn man es direct aus der ammoniakalisch gemachten Lösung mit Silberlösung fällt, ja auch mehr, als wenn man die Lösung mit bas. Bleiacetat fällt etc. Diese Beobachtung deckt sich natürlich nicht mit der von Kossel gefundenen Thatsache, dass das Nuclein die Quelle der Xanthinkörper ist: hier handelt es sich um wässrige Lösungen, das Nuclein aber ist in Wasser ganz unlöslich. Dennoch ist immerhin nicht zu bezweifeln, dass die Wirkung der verdünnten Schwefelsäure auf die Organe beim Kochen derselben damit nach Kossel's Vorschrift nicht allein darauf beruht, dass die Säure das Nuclein spaltet, sondern auch hier zu einem Theil darauf, dass die Säure die störenden Substanzen beseitigt.

Dies ist mit Bestimmtheit nach dem Verhalten der wässrigen Auszüge aus Analogie zu erschliessen. Meine Beobachtungen am Fleischextract habe ich schon erwähnt; in der Litteratur liegen ausserdem noch bestätigende Beobachtungen von G. Salomon¹⁾ vor, der aus den wässrigen Auszügen von Hundeleber und -Muskeln weit mehr Xanthinkörper erhielt, wenn er die Auszüge mit Salpetersäure kochte, als wenn er sie direct mit Ammoniak und Silberlösung fällte. Für das Kochen mit Schwefelsäure habe ich gleichfalls Beobachtungen an wässrigen Leberauszügen gemacht: sie enthalten unter Umständen direct gar kein fällbares Xanthin oder nur verschwindende Spuren, wohl aber nach dem Kochen mit Schwefelsäure.

Kossel hat bei seinen Untersuchungen diesen Punkt nicht in Betracht gezogen und im sachlichen Interesse ist es gewiss nicht zu bedauern, dass er es nicht gethan hat. Denn

¹⁾ Arch. f. Anat. u. Physiol., 1881, Physiol. Abth., S. 361.

es ist einleuchtend, dass diese Beobachtungen über die Wirkung der Säuren auf die wässrigen Auszüge geeignet sind, die Erkenntniss der wichtigen Thatsache, dass eine in Wasser unlösliche Substanz, das Nuclein, die Muttersubstanz der Xanthinkörper ist, ausserordentlich zu erschweren. Findet man in einem wässrigen Auszug direct kein Xanthin, wohl aber nach dem Kochen mit Säuren, so liegt gewiss keine Veranlassung vor, anzunehmen, dass ein unlöslicher Körper die Muttersubstanz der Xanthinkörper sei¹⁾.

Gegen die Anwendung der Salpetersäure zu dem Zweck, die Xanthinkörper durch Silberlösung fällbar zu machen, hat Kossel²⁾ eingewendet, dass die Resultate dabei leicht zu hoch ausfallen können durch die Bildung von Nitroproducten. Um diesem Einwand gerecht zu werden, wählte ich im vorliegenden Falle verdünnte Schwefelsäure. Es zeigte sich nun in der That, dass auch der Auszug aus der sterilisirten Hefe B Xanthine enthält, diese jedoch erst fällbar werden nach dem Kochen mit Säure.

Es fragte sich nun: 1. ob auch in dem Auszug der frisch digerirten Hefe A (von Versuch IX) noch störende Substanzen seien, welche durch Säuren beseitigt werden können, und 2. ob in dem Auszug der sterilisirten und dann digerirten Hefe B nach dem Kochen mit Säuren ebenso viel Xanthine enthalten seien, wie in A.

Zur Entscheidung dieser Frage wurden 10 cbcm. des eingedampften Auszuges von A und B mit je ca. 20 cbcm. 1 procentiger Schwefelsäure ca. 1—1½ Stunden gekocht, dann

¹⁾ In neuester Zeit hat sich Leo Liebermann (Ber. d. d. chem. Ges., 1888, S. 598, und Centralbl. f. d. med. Wiss., 1889, No. 10 u. 12) gegen die ganze Kossel'sche Lehre ausgesprochen. So interessant die Beobachtungen Liebermann's sind, so kann ich sie einstweilen nicht für genügend erachten, um die Kossel'sche Lehre von der Spaltung des Nucleins zu stürzen. Es ist hier nicht der Ort, dies zu erörtern, auch möchte ich Kossel darin nicht vorgreifen, ich möchte nur das betonen, dass ich auf dem Boden der Anschauungen von Kossel stehe und keinen Grund sehe, sie aufzugeben.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. VI, S. 427.

mit Ammoniak und Magnesiamischung gefällt, filtrirt, mit Silberlösung gefällt u. s. w.

Der so hergestellte Silberniederschlag aus A brauchte 5,5 cbcm. = 55 cbcm. für 100 gr. Hefe = 0,478 gr. metall. Silber, der aus B dagegen nur 2,65 cbcm. = 0,23 gr. Ag für 100 gr. Hefe (10 cbcm. des Auszuges mit Salpetersäure unter Zusatz Harnstoff gekocht u. s. w. erforderten 3,1 cbcm.).

Der Versuch zeigt also, dass der Auszug A kein Hypoxanthin in latenter Form weiter enthält, vielmehr alles durch Ag-Lösung fällbar ist. Es war danach zu erwarten, dass in den bei Digestion gebliebenen Hefe-Rückständen bei B noch mehr Xanthin — in Form von Nuclein — steckte, wie bei A. Dieses zeigte sich in der That, als die Rückstände so bearbeitet wurden, wie es Kossel¹⁾ für die Gewinnung der Xanthinkörper vorschreibt, d. h. 3—4stündiges Kochen mit 1procentiger Schwefelsäure, Entfernung der Schwefelsäure durch Baryt etc. Aus A wurde nur eine ganz minimale Quantität Silberniederschlag erhalten, aus B eine relativ ansehnliche Menge, die im Ganzen 18,2 cbcm. Rhodanlösung entsprachen.

Ganz dasselbe Resultat ergab der Versuch X. — 10 cbcm. von B gaben direct keine Silberfällung, 10 cbcm. von A gaben Silberfällung entsprechend 6,5 cbcm. Rhodanlösung. — Nachdem Kochen mit Schwefelsäure gaben: 10 cbcm. von B Silberniederschlag entsprechend 2,05 cbcm. Rhodanlösung, 10 cbcm. A 6,2 cbcm. Rhodanlösung.

Die Wirkung des Fermentes besteht also 1. in der Beseitigung störender Substanzen, 2. in der spaltenden Einwirkung auf das Nuclein. — Dass eine solche in der That vorliegt, zeigt zum Ueberflus auch noch der verschiedene Gehalt der Auszüge von A und B an Phosphorsäure. Die aus je 10 cbcm. durch Ammoniak und Magnesiamischung enthaltenen Niederschläge wurden gesammelt, gewaschen, geglüht, gewogen. Der Glührückstand ist ganz überwiegend Magnesiumpyrophosphat.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. VI, S. 426.

Es ergab sich:

bei A ¹⁾	0,170 Mg ₂ P ₂ O ₇	= 1,70 gr. für 100 gr. Hefe.
» B direct	0,085	= 0,85 » 100
» B mit SO ₄ H ₂ gekocht	0,095	= 0,95 » 100

Die Ursache der Differenz in den beiden Bestimmungen von B muss einstweilen dahingestellt bleiben.

Aehnliche Beobachtungen hat schon vor mehreren Jahren (1881) G. Salomon (l. c.) an thierischen Organen gemacht. Salomon untersuchte, wieviel Xanthin man aus Organen, namentlich Leber bekommt, wenn man sie sofort nach dem Tode extrahirt und wenn man sie vorher bis 24 Stunden liegen lässt, und fand in den Auszügen der digerirten Organe bedeutend mehr Xanthinkörper. In diesem Falle handelte es sich ohne Zweifel hauptsächlich um die Beseitigung störender Substanzen durch die Digestion oder, allgemein ausgedrückt, um den Uebergang der Xanthinkörper aus einer gelösten latenten Form in eine gelöste manifeste Form durch ein Ferment. Kochte Salomon nämlich «die bisher nicht berücksichtigten Rückstände²⁾ und Filtrate mit Salpetersäure, Schwefelsäure oder Salzsäure und addirte die so erhaltenen sehr grossen Hypoxanthinmengen zu dem freien Hypoxanthin, so ergab es sich (in einem an der Hundeleber angestellten Versuch), dass der Gesamtbestand von Xanthinkörpern nahezu der gleiche geblieben war».

Mit Absicht habe ich einige Zeilen vorher den Ausdruck «latente Form der Xanthinkörper» gebraucht, weil die Annahme störender Substanzen zwar eine sehr naheliegende, aber nicht die einzig mögliche ist. Man könnte sich auch vorstellen, dass es lösliche Zwischenproducte zwischen dem Nuclein und den Xanthinkörpern gäbe, welche erst durch Kochen mit Säuren gespalten werden. Es ist immerhin auffällig, dass die mit Ag-Lösung versetzten Auszüge aus der Hefe B auch nicht

¹⁾ Es ist leider nicht mit Bestimmtheit zu ersehen, ob der Auszug A mit Schwefelsäure gekocht war oder nicht.

²⁾ Unter «Rückstände» ist nach persönlicher Mittheilung des Autors nicht das rückständige Lebergewebe zu verstehen, sondern die restirenden wässrigen Auszüge und Fällungen durch Alkohol.

die geringste Neigung zur Abscheidung eines Silberniederschlages zeigten, dass sie durchaus kein opakes Ansehen zeigten, sondern vollkommen klar blieben. Bei künftigen Untersuchungen wird man die Möglichkeit der Existenz derartiger Zwischenstufen im Auge zu behalten haben.

Ich will übrigens nicht unterlassen, darauf hinzuweisen, dass meine Beobachtungen über die Bildung von Leucin und Tyrosin, sowie von Xanthinkörpern etc. in vollem Einklang stehen mit den Angaben Schützenberger's über die Entstehung dieser Substanzen bei der Selbstgärung der Hefe. (Vgl. die Abhandlung von Kossel in dieser Zeitschrift, Bd. V, S. 156.)

III. Welcher Bestandtheil der Hefe ist die Quelle des Zuckers?

Diese Frage soll hier zunächst nur generell beantwortet werden, d. h. nur dahin, ob der Zucker aus präformirten Kohlehydraten abstammt oder vielleicht aus dem Eiweiss abgespalten wird.

Die Beantwortung gestaltet sich ziemlich einfach. Es ist bekannt, dass sich aus der Hefe beim Kochen mit verdünnten Säuren reducirender gährungsfähiger Zucker bildet. Diese Zuckerbildung wird auf die sog. Cellulose bezogen, deren Eigenschaften demnach von denen der eigentlichen Cellulose sehr abweichend sind; wird ja doch sonst allgemein das Kochen mit Schwefelsäure zur Isolirung der Cellulose, zur Befreiung von Amylum angewendet. Ich will hier nicht auf die Frage eingehen, ob ausser der Cellulose nicht noch andere Kohlehydrate an der Zuckerbildung betheiligt sind, jedenfalls ist so viel sicher, dass in dem nach dem Kochen der Hefe mit 5procentiger Schwefelsäure während 3 $\frac{1}{2}$ Stunden bleibenden Rückstand nichts mehr nachzuweisen ist, was irgend mit Cellulose Aehnlichkeit hat: der Rückstand löst sich vielmehr, wie ich mich öfters überzeugt habe, bei einstündigem Kochen mit 3procentiger Kalilauge zu einer wenig trüben Flüssigkeit, die Trübung wiederum ist grösstentheils in Aether löslich.

Gelingt es nun, nachzuweisen, dass Hefe, welche den Process der Autodigestion durchgemacht hat, bei dem Kochen mit Schwefelsäure *ceteris paribus constant* weniger Zucker liefert, als frische, so ist damit ohne Zweifel festgestellt, dass der Zucker, welcher bei der Digestion entsteht, aus dem präformirten Kohlehydratbestand der Hefe abstammt. Dieses ist nun in der That leicht festzustellen, wie folgende Versuche zeigen:

1. 50 gr. frische Hefe (aus Versuch X) wurden mit 300 ccm. 5procentiger¹⁾ Schwefelsäure $3\frac{1}{2}$ Stunden am Rückflusskühler gekocht, filtrirt, gründlich nachgewaschen und durch Eindampfen der Waschwässer auf 500 ccm. gebracht. 5 ccm. (neutralisirt) gaben bei Bestimmung mit Fehling'scher Lösung $0,0924 \text{ CuO} = 8,38 \text{ gr. Zucker für } 100 \text{ gr. Hefe.}$

2. 50 gr. einer anderen Presshefe ebenso behandelt; auf 500 ccm. gebracht. 5 ccm. gaben 0,0860 resp. 0,0864, im Mittel $0,0862 \text{ CuO} = 7,82 \text{ gr. Zucker für } 100 \text{ gr. Hefe.}$

Im Mittel lieferte also die frische Hefe $8,10\%$ Zucker auf feuchte Substanz bezogen = $27,93\%$ der Trockensubstanz (bei 29% Trockensubstanz in der Hefe).

Dagegen ergab die Behandlung der digerirten Hefe folgende Resultate:

1. Der Rückstand von 100 gr. digerirter Hefe aus Versuch VIII wurde $3\frac{1}{2}$ Stunden am Rückflusskühler mit 600 ccm. 5procentiger Schwefelsäure gekocht, dann ebenso behandelt. 2 ccm. des auf 500 ccm. gebrachten Auszuges gaben $0,053 \text{ gr. CuO} = 6,0 \text{ gr. Zucker für } 100 \text{ gr. Hefe.}$

2. Die rückständige Hefe von Versuch IX C entsprechend 172 gr. Hefe wurde mit Wasser auf das Volumen von 860 ccm. gebracht. 5 ccm. der gut durchgeschüttelten Mischung entsprachen somit 1 gr. digerirter Hefe. Die Mischung wurde in eine Flasche gebracht und nach jedesmaligem heftigem Schütteln 3 Portionen à 250 ccm. = 50 gr. Heferückstand entnommen.

¹⁾ Unter «5procentiger» Schwefelsäure verstehe ich stets 50 gr. Schwefelsäure mit Wasser zum Volum von 1 L. aufgefüllt.

a) 250 cbcm. = 50 gr. Hefe mit 15 gr. Schwefelsäure und 60 gr. Wasser versetzt (ungefähr entsprechend 300 cbcm. 5procentiger Schwefelsäure auf 50 gr. Hefe), $3\frac{1}{2}$ Stunden am Rückflusskühler gekocht, dann filtrirt u. s. w. auf 500 cbcm. 5 cbcm. gaben $0,0617 \text{ CuO} = 5,6\%$ Zucker.

b) 250 cbcm. mit 6 gr. Schwefelsäure und 70 cbcm. Wasser (ca. 300 cbcm. 2procentige Schwefelsäure) ebenso behandelt. 5 cbcm. gaben $0,068 \text{ CuO} = 6,17\%$ Zucker.

c) 250 cbcm. mit 30 gr. Schwefelsäure und 50 Wasser (ungefähr 300 cbcm. 10procentige Schwefelsäure auf 50 gr. Hefe) u. s. w. 5 cbcm. gaben $0,0633 \text{ CuO} = 5,74\%$ Zucker.

Im Mittel sämmtlicher Versuche lieferte somit die digerirte Hefe beim Kochen mit Schwefelsäure $5,88\%$ Zucker auf feuchte Substanz bezogen oder $20,27\%$ der Trockensubstanz.

Genuine Hefe lieferte somit $2,22\%$ der feuchten Substanz oder $7,76\%$ der Trockensubstanz mehr Zucker, als Hefe, vorher digerirt. Die Differenz ist gross genug, um die Bildung von Zucker aus den Kohlehydraten zu decken, es liegt mithin kein Grund vor, auf die Eiweisssubstanzen zurückzugreifen.

Dasselbe gilt auch für die Selbstgährung der Hefe. Pasteur hat bereits die Ansicht ausgesprochen, dass die Kohlehydrate der Hefe die Quelle des Alkohols und der Kohlensäure bei der Selbstgährung seien, ohne indessen meines Wissens Beweise hierfür beizubringen. Der Nachweis ist leicht zu führen.

100 gr. Hefe (aus Versuch X) wurden mit 100 cbcm. Wasser übergossen und 2 Tage lang der Selbstgährung überlassen, dann filtrirt. Im Filtrat wurde Alkohol durch Destillation constatirt, beim Eindampfen lieferte dasselbe wenig Rückstand, in welchem Pepton und etwas Gummi nachweisbar waren. — Der Rückstand wurde $3\frac{1}{2}$ Stunden mit 600 cbcm. 5procentiger Schwefelsäure gekocht. 5 cbcm. gaben bei Gesamtvolumen von 500 cbcm. $0,0912 \text{ CuO} = 4,14\%$ Zucker oder $14,27\%$ der Trockensubstanz.

Die Differenz gegenüber der genuinen Hefe beträgt 3,96% der feuchten Substanz oder 13,66% der Trockensubstanz.

Es steht also fest, dass die Quelle der Zuckerbildung bei der Autodigestion in den Kohlehydraten der Hefe zu suchen ist. Sehr viel schwieriger gestaltet sich die Beantwortung der Frage, auf welche Kohlehydrate die Zuckerbildung zu beziehen ist. Bei dem Versuch, diese Frage zu beantworten, kam ich zu der Ueberzeugung, dass ihre Beantwortung nicht möglich ist ohne eine erneute gründliche Untersuchung der Kohlehydrate der Hefe überhaupt, welche einer besonderen Arbeit vorbehalten bleiben mag. Als wahrscheinlich kann ich es bezeichnen, dass die Quelle des Zuckers nicht die sog. Cellulose ist, sondern das Hefegummi, es bleibt indessen noch genauer zu untersuchen, ob nicht, wie Nägeli und Löw annehmen¹⁾, das Gummi selbst aus der Cellulose hervorgehen kann.

Es bedarf kaum eines Hinweises darauf, in welcher Beziehung meine Beobachtungen über die Zuckerbildung in der Hefe zur Selbstgährung derselben stehen. Die Zuckerbildung bei der Digestion ist die erste Etappe der Selbstgährung: auch bei der Selbstgährung entsteht ohne Zweifel derselbe Zucker, aber es ist nicht möglich, ihn nachzuweisen, weil er sofort weiter zerfällt. Das Chloroform lässt den ersten Theil des Vorganges bestehen, hebt den zweiten dagegen auf.

Es ist gewiss auch weiterhin in allgemein biologischer Beziehung nicht ohne Interesse, dass in einem einzelligen Organismus neben dem Invertin noch 3 andere Fermente nachweisbar sind. Fokker²⁾ hält allerdings die unter dem Einfluss des Chloroformwassers in zerkleinerten Geweben vor sich gehenden Fermentationsvorgänge ganz allgemein nicht für Enzymwirkungen, sondern für Protoplasmawirkungen, ich glaube indessen nicht, dass er damit im Recht ist; ich gedenke auf diesen Punkt noch einmal zurückzukommen.

¹⁾ Annal. der Chem., Bd. 193, S. 322.

²⁾ Centralbl. f. d. med. Wiss., 1888, S. 417.

Um zum Schluss meine Beobachtungen kurz zusammenzufassen, so ist durch dieselben Folgendes constatirt worden.

Bei der Digestion von Hefe mit Chloroformwasser (1 : 10) bei Lufttemperatur findet Selbstgärung nicht statt, dagegen enthält die Digestionsflüssigkeit nach einigen Tagen Zucker, Leucin und Tyrosin, Xanthinkörper. Die Bildung dieser Körper beruht auf einem fermentativen Process, denn sie findet nicht statt in genau ebenso angestellten Parallelversuchen, bei denen die Hefe vorher sterilisirt war. Da die Lebensäusserungen der Hefe bei Aufbewahrung in Chloroformwasser erlöschen, eine solche Hefe weder Gärung zu bewirken, noch sich zu vermehren im Stande ist, muss man annehmen, dass die genannten Prozesse auf der Wirkung eines löslichen Fermentes — Enzym's — beruhen.

Der Zucker, welcher bei dieser Fermentation entsteht, bildet ein Phenylhydrazinderivat vom Schmelzpunkt 204—205, ist reducirend, schnell gährend, linksdrehend. Die Quantität des Zuckers betrug im Mittel von 11 Versuchen 6,48% des Trockengewichtes der Hefe, im Minimum 4,24%, im Maximum 8,81%. Der Zucker geht aus dem Kohlehydratbestand der Hefe hervor. Auch bei der Selbstgärung ist eine Verminderung der Kohlehydrate nachweisbar.

Auf die Xanthinkörper wirkt die Fermentation in doppelter Weise ein: einerseits wird fast alles Nuclein der Hefe gespalten, andererseits wird das Xanthin direct fällbar durch Silberlösung, während es bei vorgängiger Sterilisirung der Hefe in geringerer Quantität im Auszug vorhanden ist und in diesem nicht direct fällbar durch Silberlösung, sondern erst nach dem Kochen mit Säuren.