

Ueber das „Invertin“ der Hefe.

Von
E. Salkowski.

(Aus dem chem. Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 3. November 1900.)

Einige Zeit nach meiner Publication über die Kohlehydrate der Hefe¹⁾ drängte sich mir der Verdacht auf, dass das Invertin, welches M. Barth²⁾ vor langen Jahren unter meiner Leitung dargestellt und beschrieben hat, mit Kohlehydraten, namentlich Gummi, verunreinigt sein möchte. Diese Vermuthung gründete sich darauf, dass das Invertin im Wesentlichen durch Ausziehen der bei 105° erhitzten Hefe mit Wasser und Fällung des Auszuges mit Alkohol dargestellt ist, das Hefegummi aber gleichfalls in Wasser löslich und durch Alkohol fällbar ist und durch Erhitzen auf 105° nicht unlöslich wird.

Meine Vermuthung bestätigte sich in der That. Es stand mir noch eine kleine Probe des Originalpräparates von Barth zur Verfügung: als die wässrige Lösung eines Theiles desselben mit Fehling'scher Lösung versetzt wurde, entstand der charakteristische, beim Erwärmen sich zusammenballende bläulich-weiße Niederschlag der Gummikupferverbindung. Derselbe wurde nach dem Abgiessen der überstehenden Flüssigkeit mit etwas Wasser ab gespült, dann in einigen Tropfen Salzsäure gelöst, die Lösung mit Alkohol absolutus versetzt; es entstand ein pulveriger, weißer Niederschlag, welcher abfiltrirt und mit Alkohol und Aether gewaschen wurde. Das erhaltene

1) Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 27, S. 492 und 3325. 1894.

2) Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 11, S. 474. 1878.

feine weisse Pulver war N-frei und stimmte in seinen äusseren Eigenschaften und in seinem Verhalten zu Reagentien, soweit die kleine Quantität die Anstellung von Reactionen zulies, mit Hefegummi überein.

Dass diese Verunreinigung des «Invertins» mit Gummi bzw. Kohlehydraten von Barth und mir übersehen worden ist, ist wohl verzeihlich, da im Jahre 1878 — in dieses Jahr fällt die Publication von Barth — so gut wie nichts von den Kohlehydraten der Hefe bekannt war¹⁾ und wir auch nicht durch besondere Erscheinungen auf die Vermuthung dieser Verunreinigung geführt wurden, indessen hatte ich, da Barth damals unter meiner Leitung gearbeitet hat und die Darstellung des Invertins im Wesentlichen nach meinen Angaben erfolgt ist, natürlich die Verpflichtung, auf den Gehalt des «Invertins» an Gummi aufmerksam zu machen. Die Verzögerung, die in dieser Hinsicht eingetreten ist, erklärt sich daraus, dass ich selbstverständlich den Befund nicht veröffentlichen wollte, ohne selbst neue Darstellung von «Invertin» gemacht und mich von der Constanz des Gummigehaltes überzeugt zu haben. Bei der Beschäftigung mit dem Gegenstand drängten sich mir noch andere Fragen auf, die ich nicht ganz unberücksichtigt lassen konnte und deren Verfolgung viel Zeit in Anspruch nahm. Meine bezüglichen Beobachtungen sind nun bei Weitem noch nicht abgeschlossen und ich würde mit der Mittheilung derselben auch noch zurückhalten, wenn nicht die neuesten Publicationen von Osborne²⁾ und Kölle³⁾ die Frage nach der Natur des Invertins in falsche Bahnen zu drängen drohten.

1) Die Arbeit von Naegeli und Löw, in welcher die Autoren «Pilzschleim» als das Kohlehydrat der Hefe beschreiben, erschien in demselben Jahre, jedoch etwas später. Ausserdem heisst es daselbst (Annal. der Chem. und Pharm., Bd. 193, S. 324): «Der Pilzschleim ist löslich in heissem Wasser, fast unlöslich in kaltem» und Naegeli spricht sich dahin aus, dass derselbe erst aus der Zellmembran beim Kochen mit Wasser entstehe, es wäre also unter keinen Umständen eine Verunreinigung des «Invertins» mit demselben zu vermuthen gewesen, auch wenn die Arbeit von Naegeli und Löw schon vorgelegen hätte.

2) Diese Zeitschr. Bd. XXVIII, S. 399.

3) Diese Zeitschr. Bd. XXIX, S. 128.

Die Darstellung des Invertins geschah im Wesentlichen nach dem von Barth beschriebenen Verfahren, nur mit den Abweichungen, welche durch die inzwischen erfolgte Verbesserung der technischen Hilfsmittel und durch die grössere persönliche Erfahrung in der Darstellung derartiger Substanzen geboten waren.

500 g beste, fast vollkommen amylnumfreie Presshefe wurde durch Ausbreiten in grossen Porzellanschalen oder auf Blechen oder Papierunterlagen bei Zimmertemperatur getrocknet, bis sie sich gut verreiben liess. Das lufttrockne Pulver zuerst bei 40° weiter getrocknet, dann 6 Stunden lang auf 105—110° erhitzt, fein gemahlen und mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührt, welcher 20—24 Stunden stehen blieb. Derselbe wurde dann mit der Nutsche abgesaugt, das gelblich gefärbte Filtrat in das 4—5fache Volumen Alkohol von 90—93% eingegossen, am nächsten Tage abfiltrirt und mit Alkohol absolutus gewaschen, der Filterrückstand einen Tag unter Aether gebracht, wiederum abgesaugt und in der Reibschale trocken gerieben. Das ganz trockene Pulver wurde in der Reibschale mit Wasser verrieben, nach kurzem Stehen filtrirt — der Filterrückstand besteht grösstentheils aus Eiweisskörpern —, das Filtrat in das mehrfache Volumen Alkohol absolut. gegossen und ebenso verfahren, wie oben angegeben. Durch Trockenreiben der ätherfeuchten Substanz in einer Reibschale wird das Invertin in Form eines weissen oder ganz leicht gelblich-weissen, äusserst feinen staubigen Pulvers erhalten, welches, wie so viele sehr feinpulvrige organische Substanzen, beim Reiben die bekannten elektrischen Erscheinungen zeigt, die das Einfüllen in Gläser und Ausschütten aus Röhren für die quantitativen Bestimmungen so sehr erschweren.¹⁾

Es wurden 4 derartige Darstellungen gemacht, nur mit einer kleinen Abweichung bei der ersten Darstellung, welche

1) Da es sich später herausstellte (siehe weiter unten), dass das invertirende Enzym gegen Alkohol weit empfindlicher ist, als ich annahm, so würde es sich empfehlen, die Berührung mit dem Alkohol möglichst abzukürzen, freilich fragt es sich, ob es dann in gleichem Maasse gelingen wird, das Eiweiss aus dem Präparat auszuschliessen.

sich indessen als unzweckmässig und fehlerhaft erwies. Es wurde nämlich dieses Mal der Versuch gemacht, die Hefe, gut vertheilt, sofort bei 35° zu trocknen. Dabei trat aber augenscheinlich Zersetzung unter Ammoniakentwicklung ein. Aus dieser nicht ganz fehlerfreien Darstellung stammt Präparat I. Das Ergebniss der zweiten und dritten Darstellung wurde zu Präparat II vereinigt, die vierte Darstellung ergab das Präparat III. Ueber die Ausbeute bei I finde ich keine Notiz. Präparat II wog lufttrocken ca. 4½ g, ebensoviel Präparat III, trotzdem für II 1 Kilo, für III nur ½ Kilo zur Darstellung verwendet worden war. Der Unterschied der Gewichte erklärt sich durch die Zusammensetzung der Präparate (siehe weiter unten).

Bezüglich der Wirksamkeit der Präparate habe ich mich auf qualitative Versuche beschränkt, da Barth ausführliche Angaben über die Wirksamkeit seiner nach dem gleichen oder fast gleichen Verfahren dargestellten Präparate gemacht hat. Nach den qualitativen Prüfungen entsprach die Wirksamkeit doch nicht dem, was man von einem rein dargestellten Ferment gegenüber der Wirksamkeit der zur Darstellung verwendeten wässerigen Auszüge erwarten musste: auch andere Beobachter haben schon bezüglich des Invertins diesen Eindruck erhalten. Das Verfahren bedingt jedenfalls eine bedeutende Schädigung des Fermentes.

Sämmtliche Präparate erwiesen sich als gummihaltig, auffallender Weise aber in sehr verschiedenem Grade. Es schien mir wünschenswerth, zunächst den Gehalt der Präparate an Gummi zu bestimmen und dann dieses selbst näher zu charakterisiren. Zur Bestimmung diente die Fällung als Gummikupfernatronverbindung und Isolirung des Gummis aus dieser. Von der Brauchbarkeit des Verfahrens habe ich mich schon vor längerer Zeit in Versuchen über die Quantität des Gummis in der Hefe bei verschiedenen Zuständen derselben überzeugt, es soll über diese später im Zusammenhang berichtet werden. Die Einzelheiten des Verfahrens gehen aus der Beschreibung des bei Präparat I eingehaltenen Vorgehens hervor.

Invertinpräparat I.

0,4359 g lufttrockenes Invertin = 0,3363 g¹⁾ asche- und wasserfrei wurden aus einem Wägeröhrchen auf etwa 100 ccm. destillirtes Wasser ausgeschüttet, welches sich in einem Becherglas befand, und zwar so, dass das Pulver möglichst auf der Oberfläche des Wassers schwimmend vertheilt war, dann einige Stunden stehen gelassen, dann auf dem Wasserbad erwärmt, die Lösung der Substanz, welche nur zögernd erfolgt, durch Umrühren mit einem mit Gummi armirten Glasstab befördert, schliesslich einige Tropfen Natronlauge hinzugesetzt. Dabei schied sich eine geringe Quantität eines flockigen Niederschlages — augenscheinlich Calciumphosphat — aus, welcher in der Flüssigkeit belassen wurde, da er die Gummibestimmung nicht stört.

Die erkaltete Lösung wurde mit 20 ccm. Fehling'scher Lösung versetzt und gelind erwärmt, wobei sich ein dicker, weiss-bläulicher, allmählich sich zusammenballender Niederschlag ausschied. Sobald derselbe sich abgesetzt hatte, wurde die überstehende Flüssigkeit in ein Becherglas abgossen, wobei einige Flöckchen des Niederschlages mitgingen, dann mit wenig Wasser abgespült, das Spülwasser in dasselbe Becherglas gegossen; die vereinigten Flüssigkeiten — etwa 200 ccm. — blieben bis zum nächsten Tage stehen. Die Gummikupferverbindung wurde in wenigen Tropfen Salzsäure gelöst — die Lösung erfolgte spielend leicht —, dann sofort 100—150 ccm. Alkohol absolutus hinzugefügt: es entstand eine milchige Flüssigkeit. Da die Ausscheidung des Gummis zögerte, wurde mit der Pipette ein Tropfen 10%ige Kochsalzlösung hinzugesetzt: es entstand sofort ein dicker, weisser Niederschlag, welcher bis zum nächsten Tage unter Alkohol stehen blieb. Aus der abgossenen blauen Lösung, mit welcher die Spülwässer vereinigt worden waren, hatten sich bis zum nächsten Tage einige wenige Flöckchen abgesetzt, aus welchen gleichfalls in der beschriebenen Weise das Gummi zur Ausscheidung gebracht und sofort mit der Hauptquantität vereinigt wurde. Diese zweite Quantität war übrigens so minimal, dass sie auch ohne merklichen Fehler hätte vernachlässigt werden können.

Das Gummi wurde auf einem getrockneten, gewogenen Filter gesammelt, sorgfältig mit Alkohol und Aether gewaschen, dann bei 110—115° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.

Es wurden erhalten 0,1798 g = 53,47% der Reinsubstanz des Invertinpräparates.

¹⁾ 0,3194 g verloren bei anhaltendem Trocknen 0,0342 g Wasser = 10,71% und hinterliessen 0,0388 g Asche = 12,15% der wasserhaltigen oder 13,07% der wasserfreien Substanz. Der Gehalt des lufttrockenen Präparates an «Reinsubstanz» betrug 77,14%.

Invertinpräparat II.

Da die Quantität des Gummis sich für die Bestimmung bei Präparat I unbequem gross erwiesen hatte, wurde, in der Erwartung, dass der Gummigehalt ungefähr ebenso gross sein würde, weniger Substanz genommen.

0,2740 g = 0,1854 g asche- und wasserfreie Substanz¹⁾ lieferte 0,0318 g Gummi = 17,17 %.

Die Ausscheidung der Gummikupferverbindung erfolgte in diesem Falle nicht sofort, sondern allmählich, was bei der geringen Concentration des Gummis in der Lösung (etwa 1:3140) erklärlich ist.

Invertinpräparat III.

1) 0,2218 g = 0,1866 g²⁾ asche- und wasserfreie Substanz lieferte 0,1208 g Gummi = 64,88 %.

2) 0,1724 g bei 115° getrocknete aschehaltige Substanz = 0,1591 g aschefreie Substanz lieferte 0,1046 g Gummi³⁾ = 65,71 %, Mittel aus beiden Bestimmungen 65,3 %.

Die 3 untersuchten Invertinpräparate enthielten also Gummi in sehr wechselnder Quantität: Nr. 1 53,47 %, Nr. 2 17,17 %, Nr. 3 im Mittel 65,3 %. Der hohe Gummigehalt des

1) 0,3944 g Substanz verloren bei anhaltendem Trocknen 0,0266 g Wasser = 6,75 % und hinterliessen 0,4009 g Asche = 25,58 % der lufttrockenen oder 24,73 % der wasserfreien Substanz. Der Gehalt der lufttrockenen Substanz an Reinsubstanz betrug somit 67,67 %. Da der Aschengehalt auffallend hoch erschien, wurde noch eine zweite Aschenbestimmung ausgeführt, welche indessen fast dasselbe ergab. 0,2186 g lufttrockene Substanz lieferte 0,0550 g Asche = 25,25 %.

2) 0,3784 g verloren bei anhaltendem Trocknen 0,0326 g Wasser = 8,88 % und hinterliessen 0,0264 g Asche = 6,98 % der wasserhaltigen oder 7,66 % der wasserfreien Substanz. Der Gehalt der lufttrockenen Substanz an «Reinsubstanz» betrug somit 83,44 %.

3) In diesem Falle ist eine Correctur angebracht. Beim Abfiltriren des Gummis fiel mir auf, dass die letzten Antheile desselben eine körnige Beschaffenheit hatten. Ich vermuthete, dass der Alkohol Chlornatrium ausgefällt haben könnte, und veraschte deshalb das erhaltene Gummi. Dasselbe hinterliess 0,0088 g geschmolzene Asche, welche, von dem Gewicht des Rohgummis = 0,1134 g abgezogen, obige 0,1046 g gaben. Es wird zweckmässig sein, die Veraschung in jedem Falle auszuführen.

Präparates III gegenüber dem relativ niedrigen in II erklärt nun auch, warum die Ausbeute bei III doppelt so hoch war, wie in II: das Plus ist nichts Anderes wie Gummi.

Eine bestimmte Erklärung dafür, warum in dem einen Falle soviel mehr Gummi in Lösung gegangen ist, wie in dem anderen, also ein soviel gummireicheres Präparat erhalten ist, vermag ich nicht zu geben, man kann sich aber wohl vorstellen, dass die Quantität des Gummis in der Hefe vielleicht nach den Einzelheiten der Fabrikation oder nach dem Alter der Hefe wechselt und dass dementsprechend Wasser von Zimmertemperatur wechselnde Quantitäten von Gummi aufnimmt. Möglicher Weise sind auch geringe Abweichungen bei der Darstellung — längere oder kürzere Zeit der Maceration des Hefepulvers mit Wasser — von Einfluss auf den Gummigehalt.

Es bleibt nun noch übrig, den Beweis zu führen, dass das gefundene Kohlehydrat in der That Hefegummi ist. Der Beweis liegt in Folgendem: Sämmtliche gewogenen Niederschläge erwiesen sich, mit der Lassaigne'schen Probe unter Anwendung von Kalium auf Stickstoff geprüft, als stickstofffrei; nach Lage der Dinge konnte es sich also nur um ein Kohlehydrat handeln. Von löslichen Kohlehydraten ist ausser dem Gummi in der Hefe nur noch Glycogen nachzuweisen, welches ich übrigens, entgegen der gewöhnlichen Annahme, nicht für identisch mit dem thierischen Glycogen halte. Die wässrige Lösung des Invertins gibt keine Jodreaction, wie auch nicht anders zu erwarten war, da man aus der Hefe Glycogen nur durch Erhitzen mit Wasser erhält. Zudem ist Glycogen nicht durch Fehling'sche Lösung fällbar und die Art der Isolirung des Kohlehydrats schliesst eigentlich jedes andere Kohlehydrat aus. Mit Rücksicht auf die Angaben von Kölle (l. c.) über die Bildung von Mannose aus seinem Invertin hielt ich es aber doch für wünschenswerth, den Nachweis des Gummis auch nach dieser Richtung hin zu liefern.

Ich muss hierbei etwas weiter ausholen. Von dem Hefegummi, über welches ich zuerst in du Bois-Reymond's Arch. f. Physiol., 1890, S. 455, Angaben machte, theilte ich in den

Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 27, 1894, S. 501 mit, dass es durch Säuren in einen gährungsfähigen, schwach rechtsdrehenden Zucker übergeht. Es zeigte sich dann, dass unabhängig von mir auch Hessenland¹⁾ den Körper schon 1892 in Händen gehabt hat, wenn auch wohl nicht so rein, da er nicht die Fällung mit Fehling'scher Lösung angewendet hat und das Gummi nach seiner Darstellung wohl mit Glycogen verunreinigt sein konnte. Seine Angaben waren mir in Folge des Ortes der Publication ebenso entgangen, wie ihm die meinigen aus dem Jahre 1890. Hessenland hat auch den bei der Hydrolyse des Gummis entstehenden Zucker schon untersucht und gefunden, dass er aus einem Gemisch von d-Mannose mit wenig Dextrose besteht.

Da hier im Hinblick auf die Angaben von Kölle nur die d-Mannose von Interesse war, so habe ich mich darauf beschränkt, zu untersuchen, ob diese leicht aus dem Hefegummi und dem aus dem Invertin isolirten Kohlehydrat zu erhalten ist.

Ca. 4 g lufttrockenes Hefegummi, nach dem früher von mir (l. c.) beschriebenen Verfahren aus Presshefe dargestellt, wurden mit 300 cem. 5%iger Schwefelsäure (15 g mit Wasser auf 300 cem. gebracht) in einem Kolben 6 Stunden im Wasserbad (der Kolben in dieses versenkt) erhitzt, von Zeit zu Zeit das verdampfte Wasser ersetzt. Ab und zu wurden Proben der Flüssigkeit durch Neutralisation mit Natronlauge und Zusatz von Fehling'scher Lösung auf Gehalt an Gummi geprüft: nach der angegebenen Zeit fiel die Gummireaction negativ aus. Die Flüssigkeit wurde nun mit heisser Barytlösung (aus umkrystallisirtem Aetzbaryt) nahezu, dann mit Baryumcarbonat vollends neutralisirt, vom Baryumsulfat abfiltrirt, die klare farblose Lösung in einer grossen Schaale bei gelinder Temperatur auf dem schwach erhitzten Wasserbad eingedampft, von etwas ausgeschiedenen Baryumcarbonat abfiltrirt und, nachdem eine Probe zur Anstellung von Zuckerreactionen abgenommen war, die noch etwas eingeengte abgekühlte Lösung mit einigen

¹⁾ Zeitschrift des Vereins für Rübenzuckerindustrie. Bd. 42, S. 671.

cem. Phenylhydrazin, in 30%iger Essigsäure bis zur schwach sauren Reaction gelöst, versetzt. Beim Umrühren erstarrte die Flüssigkeit zu einem dünnen Brei von Krystallen, welche abfiltrirt, ausgewaschen und einmal aus Alkohol umkrystallisirt wurden.

Zur Identificirung des in kleinen, schwach gefärbten Krystallen erhaltenen Mannosehydrazons wurde an der über Schwefelsäure getrockneten Substanz eine N-Bestimmung nach Dumas ausgeführt.¹⁾

0,1682 g gaben 15,5 cem. N bei 21° und 755 mm. B.
Daraus berechnen sich 0,0175 g N = 10,40%.

Mannosehydrazon erfordert 10,37%.

Es wurden nun die Reste der bei den Untersuchungen der Invertinpräparate auf Gummi erhaltenen Substanzen vereinigt, dann noch aus ca. 1 g des Präparates III Gummi dargestellt und mitverarbeitet, im Ganzen betrug die Quantität 0,7—0,8 g. Die Substanz wurde mit 150 cem. 5%iger Schwefelsäure in der angegebenen Weise behandelt. Die erhaltene eingedampfte Lösung gab mit essigsauerm Phenylhydrazin sofort das charakteristische Hydrazon vom Schmelzpunkt 199° nach einmaligem Umkrystallisiren aus Alkohol. Zum Ueberfluss wurde noch die N-Bestimmung ausgeführt.

0,1905 g gaben 17,0 cem. N bei 16° und 769 mm. Bar.

Daraus berechnet sich N = 0,0200 g = 10,50%, erfordert 10,37%.

Es steht also fest, dass das nach dem Barth'schen bezw. meinem Verfahren dargestellte Invertin mit Hefegummi verunreinigt ist.

Angesichts dieser Thatsache gewinnt nun die Angabe von Kölle, dass er durch Behandlung seines Invertins mit Säuren Mannose erhalten habe, eine ganz andere Bedeutung. Es ist nicht daran zu zweifeln, dass auch die von Osborne und Kölle erhaltenen Invertinpräparate mit Gummi verunreinigt gewesen sind, und sehr erklärlich, da diese Präparate im Wesentlichen nach demselben Verfahren dargestellt sind.

¹⁾ Die Elementaranalysen sind, ebenso wie die des Invertins, von dem Assistenten des Laboratoriums, Herrn Dr. C. Neuberg, ausgeführt.

jedenfalls keine Operation vorgenommen ist, durch welche das von vornherein vorhandene Gummi beseitigt wird. Die Dialyse ist, wie ich mich an Hefegummilösung überzeugt habe, nicht im Stande, diesen Effect zu leisten. Der Gehalt an Gummi ist vielleicht sogar in seinen Präparaten noch grösser gewesen, wie in den meinigen, weil Osborne (l. c., S. 408) die vorher mit Alkohol verriebene, dann wieder möglichst von Alkohol befreite Presshefe 6 Tage bei 30–35° mit Chloroformwasser stehen liess. Dadurch musste natürlich die Auslaugung des Gummis aus der Hefe ausserordentlich befördert werden. Ausserdem enthält der so erhaltene Auszug, wie ich mich überzeugt habe, auch reichlich die Spaltungsprodukte des Eiweisses und Nucleins, doch scheinen dieselben keine Verunreinigung des stark gummihaltigen Invertins zu bewirken.

Ich bin überzeugt: wenn Osborne und Kölle ihre Präparate durch Versetzen der Lösung mit Fehling'scher Lösung und Zugabe von ein wenig Natronlauge prüfen wollen, werden sie sich von der Gegenwart von Gummi in denselben leicht überzeugen können. Es handelt sich also in den Versuchen von Kölle nicht um aus dem Molekül des Invertins abgespaltene Mannose, diese entspricht vielmehr dem Gummi, durch welches sein Invertin verunreinigt war.

Osborne¹⁾ selbst wirft schon die Frage auf, ob seinem Invertin nicht vielleicht ein Kohlehydrat beigemischt sein könnte, erledigt sie aber durch die Gegenfrage, warum denn die von ihm dargestellte Substanz durchaus ein Gemenge sein müsse, und nicht vielmehr selbst das gesuchte Ferment, und als solches gleichzeitig stickstoffhaltig und kohlehydrathaltig sein könne. Er erinnert dabei an das Chitin und Hyalin, deren procentische Zusammensetzung er vergleichend mit der seines Invertins zusammenstellt, und sieht, wie es scheint, eine gewisse Stütze für seine Anschauung in dem Verhalten seiner Substanz beim Erhitzen mit Säuren. Seine Entscheidung in der Frage ist um so auffallender, als Wroblewsky²⁾ schon angegeben hat, dass ein von ihm untersuchtes Invertinpräparat von Merck

1) l. c., S. 423.

2) Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 31, S. 1134.

beträchtliche Mengen eines Kohlehydrates enthält, wenn er auch die Natur dieses Kohlehydrates nicht erkannt hat, es vielmehr für von allen Kohlehydraten verschieden hält. Nach den Angaben von Wroblewsky ist kein Zweifel, dass er Hefegummi in Händen gehabt hat. Dafür spricht ganz besonders, dass sein Kohlehydrat keine Jodreaction gab, sich rechtsdrehend erwies, nach der Inversion aber nur noch eine ganz geringe Rechtsdrehung vorhanden war. Alles dieses entspricht genau dem Verhalten des Hefegummis (Mannose ist bekanntlich schwach rechtsdrehend.) Hätte Wroblewsky meine Arbeit über die Kohlehydrate der Hefe in den Berichten der deutschen chemischen Gesellschaft nachgeschlagen, so würde er über die Natur seines Kohlehydrates wohl nicht im Zweifel geblieben sein.

Die noch vorhandenen Reste meiner Invertinpräparate habe ich zu einigen orientirenden Versuchen über die Natur der ausser dem Gummi noch darin enthaltenen organischen Substanz benutzt. Ich drücke mich absichtlich so aus und nicht des Invertins, die Gründe dafür werden aus der späteren Ausführung hervorgehen.

1. Barth hat sich schon mit Bestimmtheit dahin ausgesprochen, dass das Invertin kein Eiweisskörper ist, Osborne ist derselben Ansicht, und ich muss beiden Autoren unbedingt beistimmen: das Invertin ist kein Eiweisskörper, auch nicht im weitesten Sinn des Wortes, Wroblewsky ist mit seiner gegentheiligen Ansicht durchaus im Unrecht.

Meine Invertinpräparate gaben, in Substanz angewendet — kleine Messerspitzen —, die Farbenreactionen der Eiweisskörper: Xanthoprotein-Reaction, Adamkiewicz's, Millon's, Liebermann's Reaction entweder gar nicht oder — ich möchte sagen — so schattenhaft, dass von vornherein kein Zweifel sein konnte, dass sie auf eine Verunreinigung mit Eiweiss zurückzuführen seien. Alle 3 Präparate verhielten sich gleich: dass in der That noch Spuren von Eiweiss vorhanden waren, liess sich leicht zeigen.

1 g des bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Präparates I wurde in 100 ccm. Wasser gelöst: dabei blieb eine geringe Quantität schleimiger Klümpchen ungelöst, welche

sich auch beim Erhitzen der Lösung bis zum Sieden nicht lösten, die Lösung wurde filtrirt, der Rückstand vom Filter in ein Becherglas gespritzt und in diesem durch Decantiren sorgfältig gewaschen. Die Substanz gab so in feuchtem Zustande intensive Millon'sche und Xanthoprotein-Reaction, sie löste sich in schwacher Natronlauge, auf Zusatz von Essigsäure zu dieser Lösung entstand eine feinflockige Fällung. Darnach unterliegt es keinem Zweifel, dass das Invertin I mit Eiweiss verunreinigt war. Dasselbe wurde auch an einer kleinen Quantität des Präparates II festgestellt.

Bezüglich der Reactionen der trockenen Substanz ist noch nachzuholen, dass dieselbe beim Erhitzen im Röhrchen reichlich Pyrrol entwickelte und Spuren von Schwefelwasserstoff. Die Pyrrolreaction ist so stark, dass sie sicher nicht auf die Verunreinigung mit Eiweiss zurückgeführt werden kann, sondern der Substanz selbst zukommt.

Bezüglich der Reactionen der nicht ganz 1%igen Lösung (siehe oben) kann ich mich kurz fassen, sie stimmten im Wesentlichen mit den Angaben Osborne's überein. Abweichend war Folgendes: 1. die Biuretreaction fiel bei mir ganz negativ aus, 2. Kupfersulfat und -acetat bewirkte keine Fällung oder Trübung, 3. Bleiacetat und Bleisubacetat bewirkte in der angegebenen Lösung eine leichte Trübung, in einer Lösung unbekannter Concentration aus dem Präparat II eine weit stärkere. Es ist wohl möglich, dass die beigemischten phosphorsauren Salze an der Bildung des Niederschlages betheilig sind, 4. Brücke'sches Reagens + Salzsäure bewirkte starke Opalescenz, indessen setzte sich auch bei tagelangem Stehen kein Niederschlag ab.

2. Die Elementarzusammensetzung. — Barth, Osborne und Kölle haben ihre Präparate analysirt und folgende Zahlen erhalten:

	C	H	N
Barth im Mittel...	44,44	8,4	5,95
Osborne 1)	44,69	6,51	6,10
Kölle	(43,9 bis 45,65	6,45 bis 7,34	8,32 bis 8,61 2)

1) Für das durch Dialyse gereinigte Invertin im Mittel.

2) Hinsichtlich des N-Gehaltes spricht Kölle selbst Zweifel aus.

Da es als sicher anzunehmen ist, dass alle analysirten Präparate Gummi enthielten, und zwar in unbekannter Quantität, so sind die Zahlen nicht direct verwerthbar, indessen könnte man doch an eine Umrechnung denken, wenn sich der N-Gehalt der gummifreien Substanz sicher ermitteln liesse. Daraus muss sich natürlich der Gummigehalt der analysirten Substanz ableiten lassen.

Die Elementaranalyse meines Präparates II ergab folgende Werthe:

1. 0,1588 g der bei 105° getrockneten Substanz (= 0,11523 g Reinsubstanz) gaben mit chromsaurem Blei und vorgelegtem metallischen Kupfer im offenen Rohr verbrannt: 0,2271 CO₂ und 0,0888 H₂O:

2. 0,1560 g (= 0,1132 g Reinsubstanz) gaben 0,2247 CO₂ und 0,0870 H₂O:

3. 0,1633 g (= 0,1185 g Reinsubstanz) gaben 8,9 cem. N bei 21° und 756 mm. Bar.:

4. 0,1863 g (= 0,1351 g Reinsubstanz) gaben 9,8 cem. N bei 20° und 757 mm. Bar.

Daraus berechnet sich in Procenten:

	I.	II.	III.	IV.
C	53,75	54,13	—	—
N	8,56	8,54	—	—
H	—	—	8,55	8,26

Im Mittel C 53,94%, H 8,55%, N 8,41%.

Da der Gehalt des analysirten Präparates an Gummi bekannt ist (= 17,17%) und andererseits die Zusammensetzung des Hefegummis (C 42,11%, H 6,43%¹⁾, so lässt sich die Zusammensetzung des gummifrei gedachten Präparates leicht berechnen. Sie ergibt sich zu:

C 56,40%, H 8,99%, N 10,15%.

Selbstverständlich hat diese Angabe der Zusammensetzung, als auf einer indirekten Analyse beruhend und des hohen Aschegehaltes wegen, nur den Werth einer gewissen Annäherung. Es ist klar, dass von irgend einer Uebereinstimmung in der Zusammensetzung meines Präparates II und

¹⁾ Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 27, S. 492.

der Präparate der genannten Autoren, gummifrei berechnet, nicht die Rede sein kann, die Mühe der genaueren Berechnung glaubte ich mir ersparen zu können.

Die Analyse des bei 105—110° getrockneten Präparates III ergab folgende Werthe:

1. 0,2103 g (= 0,1942 g Reinsubstanz) gaben 0,3440 CO₂ und 0,1496 g H₂O:

2. 0,1587 g (= 0,1466 g Reinsubstanz) gaben 7,3 ccm. N bei 17° und 760 mm. Bar.:

3. 0,1562 g (= 0,1442 g Reinsubstanz) gaben 7,4 ccm. N bei 17° und 760 mm. Bar.

Hieraus berechnet sich:

C.	48,31	—	—
H	8,58	—	—
N		5,79	5,96

Die Substanz enthielt im Mittel von zwei nahe aneinanderliegenden Bestimmungen 65,30% Gummi. Daraus berechnet sich für die gummifreie Substanz die Zusammensetzung in Procenten:

C 59,99, H 12,54, N 16,86.

Wie diese Differenzen in meinen eigenen Präparaten¹⁾ und zu denen der früheren Untersucher zu erklären seien, ist einstweilen nicht zu sagen, jedenfalls geht aus den Ergebnissen hervor, dass man die Illusion, auf einem einfachen Wege zu einer einheitlichen Substanz zu gelangen, aufgeben muss: nach unseren jetzigen Kenntnissen über die complicirte Zusammensetzung des Zellinhaltes überhaupt und — worauf ich weiter unten noch zurückkomme — der Hefezellen im Besonderen, war dieses auch von vornherein höchst unwahrscheinlich. Ehe man aber an Trennungen innerhalb des stickstoffhaltigen Atomcomplexes denken kann, muss man erst einmal diesen frei von accessorischen Aschebestandtheilen und frei von Gummi

¹⁾ Möglicher Weise beruht sie darauf, dass der Gummigehalt in Präparat II in Folge der starken Verdünnung bei der Analyse (circa 1:3140, siehe oben S. 310) zu niedrig gefunden ist; leider konnte ich diese Vermuthung nicht prüfen, da ich nichts mehr von dem Präparat besass.

in Händen haben. Was das Freisein von Asche betrifft, so hat Osborne es durch sein Dialyseverfahren im Wesentlichen erreicht, und es wird schwerlich einen besseren Weg dazu geben. Die Trennung vom Gummi wird voraussichtlich grössere Schwierigkeiten machen. Es liegt sehr nahe, zu versuchen, ob man nicht an Stelle des Wassers, welches so reichlich Gummi löst, andere Extractionsmittel für das erhitzte Hefepulver anwenden könnte. Dieser Weg scheint aber wenig aussichtsvoll zu sein. Ich habe als Extractionsmittel Glycerin und alkoholhaltiges Wasser (1 Theil Alkohol, 2--3 Theile Wasser) benutzt, und zwar stets im Verhältniss von 10 g Hefepulver auf 100 ccm. des Extractionsmittels und stets im Thermostaten bei 40° 24—48 Stunden lang. Was das Glycerin betrifft, so zeigte es sich, dass Glycerin von 1,23 D allerdings so gut wie nichts von Gummi löste, aber auch fast nichts von Ferment, verdünntes Glycerin (4 Vol. Glycerin, 1 Vol. Wasser) mehr Ferment auszog, aber auch reichlich Gummi.

Die Auszüge mit alkoholhaltigem Wasser erwiesen sich äusserst gummiarm, aber gänzlich wirkungslos. Die Unwirksamkeit kann entweder davon abhängen, dass das Enzym nicht in Lösung geht, oder davon, dass der Alkohol selbst in dieser Verdünnung bei 40° zerstörend auf das Ferment einwirkt. Die Entscheidung war sehr einfach. Von einem sehr energisch wirkenden Auszug aus erhitzter Hefe wurden zwei gleiche Antheile abgemessen, der eine mit $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ des Volumens Alkohol versetzt, der andere mit ebensoviel Wasser, die Proben im Thermostaten aufbewahrt. Nach 24 Stunden erwies sich die mit Wasser versetzte Probe sehr energisch wirksam, die alkoholhaltige völlig unwirksam. Der Alkohol wirkt also auf das invertirende Ferment weit stärker ein, als man im Allgemeinen anzunehmen pflegt. Ich glaube nicht, dass andere Extractionsmittel weiter führen werden.

Es bleibt also nur die Anwendung von Trennungsmitteln in der gemeinsamen Lösung von Ferment und Gummi oder die Behandlung der fertigen Präparate mit Lösungsmitteln übrig. In dieser Beziehung habe ich Folgendes festgestellt:

a) Die so vielfach mit Erfolg benutzte Anwendung von

Neutralsalzen erwies sich als gänzlich erfolglos. Chlornatrium, Magnesiumsulfat, Ammonsulfat bewirkten, in wässerigen Hefenzug bis zur Sättigung eingetragen, überhaupt keine Fällung.

b) Die fractionirte Fällung mit Alkohol. Eine ca. 1%ige Lösung des Präparats III wurde mit dem gleichen Volumen Alkohol absolutus versetzt. Der relativ reichlich entstehende Niederschlag besteht überwiegend aus Gummi. Das Filtrat wird mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt, der spärliche Niederschlag enthielt nur sehr wenig Gummi. Das alkoholische Filtrat vom zweiten Niederschlag hinterliess übrigens überraschender Weise beim Verdunsten ein wenig eines fettigen, nicht P-haltigen Rückstandes, was um so auffallender ist, als das Präparat aus der wässerigen Lösung mit Alkohol ausgefällt und gut mit Aether gewaschen war. Der Gehalt an fettartiger Substanz, wenn er auch nur gering war, muss natürlich den Gehalt der Substanz an C und H in die Höhe treiben.

c) Die Behandlung mit Eisessig, bei welcher man von vornherein darauf verzichtet, ein wirksames Präparat zu erhalten, und auch an die Möglichkeit denken muss, ein essigsaures Derivat zu bekommen. Behandelt man ein gummihaltiges Präparat in der Wärme mit Eisessig und filtrirt nach dem Erkalten, so bleibt das Gummi ganz ungelöst und ist durch Abfiltriren, Auswaschen mit Eisessig, dann Alkohol absolutus und Aether vollkommen frei oder in anderen Fällen fast vollkommen frei von Stickstoff zu erhalten. Andererseits ist in der eisessigsauren Lösung, wenn man erst nach dem Erkalten filtrirt, so gut wie nichts von Gummi enthalten. Versetzt man die eisessigsaure Lösung mit einer relativ grossen Quantität Alkohol absolutus, dann mit ebensoviel Aether (ebensoviel wie Alkohol), so fallen Flocken aus, welche frei von Gummi und ziemlich aschearm sind.

Nachträglich hat sich übrigens herausgestellt, dass man fast gummifreie und doch ziemlich energisch wirkende Auszüge erhält, wenn man das vorher (auf 110°) erhitzte Hefepulver nur etwa eine halbe Stunde mit Wasser bei Zimmertemperatur behandelt.

3. Die Asche des «Invertins» besteht hauptsächlich aus Phosphaten und zwar überwiegend aus Magnesiumphosphat neben wenig Calciumphosphat.¹⁾ Die wässrige Lösung der Asche, insoweit man von einer solchen sprechen kann, gibt allerdings auch schwache Phosphorsäurereaction, jedoch ist der Nachweis von Kalium (oder Natrium in entsprechender Quantität) nicht zu führen und die Phosphorsäurereaction könnte auch wohl von der Löslichkeit des Calciumphosphats in Wasser abhängen. Der grosse Reichthum von Phosphorsäure in der Asche legt den Gedanken nahe, dass der Phosphor wenigstens zu einem Theil organisch gebunden sein könnte. Ich habe darüber folgende Versuche gemacht:

a) 40 ccm. der wässrigen Lösung des Invertinpräparates I, welche etwas weniger als 0,4 g Substanz entsprachen,²⁾ wurden eingedampft, mit Soda + Salpeter geschmolzen, die Schmelze in verdünnter Salpetersäure gelöst, durch Eindampfen von salpetriger Säure befreit, dann mit Ammoniak alkalisirt und bis zum nächsten Tag stehen gelassen, dann wurde von dem entstandenen Niederschlag abfiltrirt, mit NH_3 -haltigem Wasser nachgewaschen, aus dem Filtrat der grösste Theil des NH_3 durch Eindampfen entfernt, mit Salpetersäure angesäuert, mit Ammoniummolybdat gefällt u. s. w. Es wurden 0,0284 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ erhalten, entsprechend — für 0,4 g Substanz — einem P-Gehalt von 1,98%. Diesen Phosphor kann man als organisch gebunden betrachten, wenn man von der im Wesentlichen sicher richtigen Annahme ausgeht, dass die Asche soviel Calcium, bezw. Magnesium enthält, dass diese Basen zur Bindung der präformirt vorhandenen Phosphorsäure ausreichen.

b) Die aus dem Invertin II durch Alkoholbehandlung erhaltene Fraction II, deren Gewicht allerdings nur 0,0888 g betrug, wurde in Wasser gelöst. Die Lösung erfolgt leicht und klar. Die etwas gelblich gefärbte Lösung wurde mit

1) Ausserdem enthält die Asche nicht ganz unerheblich Calciumsulfat, welches beim Behandeln der Asche mit Salzsäure in der Kälte ungelöst zurückbleibt.

2) Bei der Auflösung (siehe S. 315) blieben Eiweissflocken ungelöst, deren Quantität nicht bestimmt ist.

Ammoniak und Chlormagnesiummischung versetzt, wobei sie ein opalescentes Aussehen annahm. Nach 24 Stunden hatte sich MgNH_4PO_4 krystallinisch ausgeschieden. Es wurde erhalten 0,0118 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (entsprechend einem P-Gehalt von 3,68%), das Filtrat wurde eingedampft, mit Soda + Salpeter geschmolzen u. s. w. Nach der Molybdänmethode wurde erhalten 0,0030 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,94\%$ P. Diesen Phosphor wird man mit höchster Wahrscheinlichkeit als gebundenen ansehen müssen, er ist allerdings sehr gering, aber man wird auch mit der Möglichkeit rechnen müssen, dass in der ersten stark ammoniakalischen Lösung eine Abspaltung von Orthophosphorsäure stattgefunden haben kann, die zuerst ausgeschiedenen 0,0118 g MgNH_4PO_4 also nicht vollständig auf präformirte Phosphorsäure zu beziehen sind.

c) Der aus der Eisessiglösung des Invertinpräparates III durch Alkohol- und Aetherzusatz erhaltene, mit Alkoholäthergemisch, dann mit Aether gewaschene Niederschlag wurde auf einem gewogenen Filter gesammelt und bis zur Gewichtconstanz getrocknet. Sein Gewicht betrug 0,1016 g. Derselbe wurde mit Soda + Salpeter verbrannt, was allerdings nicht vollkommen exact durchzuführen war, da der Niederschlag sammt dem Filter (Schleicher und Schüll aschefrei Nr. 590) verbrannt werden musste. In der Lösung der Schmelze wurde die Phosphorsäure nach vorgängiger Fällung mit Ammonmolybdat wie gewöhnlich bestimmt. Erhalten 0,0320 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Daraus berechnet sich der Gehalt des Präparates an P zu 8,80% (20,15% P_2O_5). Da die Substanz noch Kalk und Magnesia enthalten haben konnte, wurden diese im Filtrat von der Molybdänfällung bestimmt. Zu dem Zweck wurde dasselbe mit NH_3 alkalisirt und mit Ammonoxalat versetzt; der ausgeschiedene oxalsaure Kalk nach 24 Stunden abfiltrirt. Es wurden erhalten 0,0014 g CaO. Im Filtrat + Waschwasser wurde Magnesium bestimmt. Zu dem Zweck wurde dasselbe auf dem Wasserbad bei Erhaltung der ammoniakalischen Reaction auf etwa $\frac{1}{2}$ eingedampft, dann noch etwas NH_4Cl und Na_2HPO_4 hinzugefügt, nach 20stündigem Stehen das ausgeschiedene MgNH_4PO_4 abfiltrirt etc. Erhalten 0,0046 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

Nimmt man an, dass die Molybdänlösung ganz frei von Ca und Mg war, ferner, dass diese in der Substanz vollständig als Phosphate vorhanden waren, so wäre eine dementsprechende Quantität $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ von der gefundenen abzuziehen. Der erhaltene Kalk entspricht $0,0028 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Es sind also $0,0028 + 0,0046 = 0,0074 \text{ g}$ von den oben erhaltenen $0,0320 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ abzuziehen, das ergibt $0,0246 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ als ganz sicher aus organischem Phosphor stammend = $6,77\%$ P (= $15,48\%$ P_2O_5). Dieser Werth ist als der Minimalwerth anzusehen.

Ich kann diese Mittheilungen nicht schliessen, ohne meine Ansichten über die Chancen auszusprechen, welche der Versuch, das invertirende Ferment oder Enzym selbst, also nach der jetzt gebräuchlich werdenden Nomenclatur die Saccharase oder Sucrase,¹⁾ zu isoliren, bietet. So lange man nur ein lösliches Enzym der Hefe kannte, nämlich das Invertin, wie es zur Zeit der auf meine Veranlassung unternommenen Versuche von Barth der Fall war, waren die Versuche, das Enzym zu isoliren, durchaus berechtigt. Die Sachlage hat sich aber seitdem ausserordentlich zu Ungunsten der Lösbarkeit der Aufgabe verschoben. Bei meinen Versuchen über die Auto-digestion der Hefe habe ich drei bisher unbekannte Enzyme in der Hefe aufgefunden:²⁾ 1. ein eiweisspaltendes, welches in seiner Wirkung dem Trypsin sehr nahe steht, jedoch mit dem Unterschied, dass es noch energischer spaltend zu wirken scheint, da die digerirte Flüssigkeit nichts Wesentliches von Albumosen oder Pepton enthält. M. Hahn und Geret³⁾ haben dasselbe kürzlich aus Hefepresssaft isolirt und festgestellt, dass es sich von dem Trypsin dadurch unterscheidet, dass es am besten bei saurer Reaction wirkt.

F. Kutscher ist freilich, wie ich aus einem mir freund-

1) Oppenheimer, Die Fermente, 1900, S. 202.

2) Centralblatt f. d. med. Wissensch., 1889, Nr. 13. — Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 506. — Zeitschr. f. klin. Med., Suppl. zu Bd. 17, S. 77, 1890.

3) Zeitschr. f. Biol., Bd. 40, S. 117 u. ff.

lichst übersandten Separatabdruck aus den Sitzungsberichten der Gesellschaft etc. zu Marburg, 1900, Nr. 5, Juni, über einen am 20. Juni 1900 gehaltenen Vortrag ersehe, bezüglich meines Antheils an der Auffindung des proteolytischen Enzyms der Hefe wesentlich anderer Ansicht. Er sagt l. c. S. 70: „Die ersten Angaben, welche auf das Vorhandensein starker proteolytischer Enzyme im Innern der Hefe hinweisen, verdanken wir Schützenberger (Bull. de la soc. chimique de Paris T. 21, 1874, S. 194 u. 204, weiter die Gährungserscheinungen 1876) und Kossel (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IV, S. 294 und Bd. VII, S. 14). Die beiden genannten Forscher überliessen gewaschene Hefe der Selbstgärung bei 37—40° und konnten danach eine starke Zunahme der wasserlöslichen Substanz feststellen. Unter denselben fanden sie in reichlicher Menge Tyrosin, Leucin, freie Alloxurbasen und freie Phosphorsäure. Es sind das lauter Substanzen, die nur aus zersetzten Nucleinen und Eiweisskörpern der Hefe stammen konnten. Die folgenden Arbeiten von Salkowski (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIII, S. 506 und Zeitschr. f. klin. Md., Bd. 17, Suppl.) und Hahn (Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 31, S. 200 u. 2333) haben über die Natur des proteolytischen Enzyms in der Hefe und den Abbau, den die Eiweisskörper durch dasselbe erfahren, nichts wesentlich Neues ergeben.

Demgegenüber sehe ich das wesentlich Neue in meinen Arbeiten in dem von mir gelieferten Nachweis, dass die Eiweisspaltung auf der Wirkung eines in der Hefezelle vorhandenen, bei Abtödtung desselben freiwerdenden, löslichen Enzyms beruht. Diesen Nachweis kann ich an der von Kutscher citirten Stelle nicht finden.

In der ersten Arbeit von Kossel,¹⁾ welche Kutscher citirt, findet sich und zwar auf S. 294, nur ein kurzer Hinweis auf Schützenberger. Es heisst daselbst:

„Ich glaube nach den mitgetheilten Resultaten das Nuclein als die Quelle der Xanthinkörper bezeichnen zu dürfen, die nach den Untersuchungen von Schützenberger bei der

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 290.

Selbstgährung der Hefe auftreten. Daneben erfolgt bei dieser Selbstgährung eine Abgabe von Phosphorsäure.

In der zweiten citirten Arbeit von Kossel¹⁾ heisst es l. c. S. 14:

Diese Versuche geben freilich noch keinen Aufschluss darüber, ob überhaupt in den Geweben solcher Organismen, welche gezwungen sind, von ihrer eigenen Körpersubstanz zu leben (im Orig. nicht gesperrt S.), eine Zersetzung von Nuclein stattfindet. Für die Entscheidung dieser Frage dienten Versuche an Hefe.

Lässt man Hefe mit Wasser einige Stunden bei warmer Temperatur stehen, so tritt bekanntlich Kohlensäureentwicklung auf, das Wasser wird sauer, enthält bald Phosphorsäure, Leucin, Tyrosin, Hypoxanthin u. s. w. — genug, es zeigen sich chemische Vorgänge ohne gleichzeitige Aufnahme von Nahrungstoff.

Aus dem citirten Wortlaut geht hervor, dass Kossel seine Versuche in einer ganz anderen Absicht und unter ganz anderen Bedingungen angestellt hat. Es ist ja möglich, dass auch unter diesen Bedingungen das eiweisspaltende Enzym mitwirkt, aber diese Frage wird hier garnicht berührt, da ja ausdrücklich von Lebensvorgängen gesprochen wird und über etwaige Enzyme mikroskopischer Organismen unter diesen Bedingungen, d. h. wenn sie leben, natürlich nichts festgestellt werden kann. Die Versuche Kossel's berühren also die vorliegende Frage nicht, und es ist mir unverständlich, wie Kutscher sie in diesem Zusammenhang citiren kann.

Was Schützenberger betrifft, so habe ich bisher angenommen, dass auch seine Angaben sich nur auf die sogenannte Selbstgährung beziehen. Das ist die allgemeine Annahme, und auch Kutscher spricht nur von dieser. In der Arbeit von M. Hahn und Geret findet sich nun aber erwähnt, dass Schützenberger auch Beobachtungen an mit kreosothaltigem Wasser übergossener Hefe angestellt und bei dieser eine beträchtliche Verarmung der zurückbleibenden Hefe an Stickstoff festgestellt habe. Bei diesen Versuchen, die

1. Diese Zeitschrift. Bd. VII. S. 7.

mir bisher unbekannt geblieben waren, handelt es sich höchstwahrscheinlich um die Wirkung eines eiweiss-spaltenden Enzyms. Es ist natürlich irrelevant, ob mir dieser Versuch bekannt war oder nicht, ich kann für mich, vorausgesetzt, dass in diesen Versuchen von Schützenberger die Hefe sicher abgetödtet und Bakterienwirkung ausgeschlossen war, nur noch in Anspruch nehmen, die richtige Deutung für den Vorgang gegeben zu haben. Diese Versuche hat aber Kutscher sicher nicht im Auge gehabt, denn er spricht nur von Selbstgährung, und dass diese nicht die Existenz eines eiweiss-spaltenden Enzyms beweist, liegt auf der Hand.

Bezüglich der Wirkungen des Enzyms der Hefe habe ich festgestellt, was nach dem damaligen Stand unserer Kenntnisse über die Constitution des Eiweisses festzustellen war, wenn ich auch zugeben muss, dass schon damals einige Ergänzungen, namentlich in Bezug auf Peptonbildung, möglich und wünschenswerth gewesen wären.

Kutscher selbst hat, wie ich, Versuche über die Selbstverdauung der Hefe unter Anwendung von Chloroformwasser angestellt, mich jedoch nicht als Autor des Verfahrens erwähnt. Nun beanspruche ich ja nicht, jedesmal genannt zu werden, wenn Jemand dieses in allgemeiner Anwendung stehende, von mir herrührende Verfahren benutzt, wohl aber ist das erforderlich, wenn ohne das unvermeidlich Missverständnisse entstehen. Wenn Kutscher z. B. sagt: «Dass die von mir benutzte Methode einer ausgedehnten Anwendung fähig ist, um uns über die intracellulären Enzyme der Mikroorganismen zu unterrichten, ist klar. Sobald sie sich, wie die Hefe, in Massenculturen gewinnen und auswaschen lassen, muss ihre Selbstverdauung uns eine schnelle Antwort auf die Frage nach dem Vorhandensein proteolytischer, intracellulärer Enzyme und deren Natur geben,» so wird wohl Niemand auf die Vermuthung kommen, dass diese von Kutscher benutzte «Methode», von welcher er rühmt, dass sie einer ausgedehnten Anwendung fähig sei, nichts Anderes ist, als das von mir angegebene und zuerst an demselben Object angewendete, seitdem vielfach zur Auffindung von Enzymen und zum Studium der Spaltungsvorgänge benutzte Verfahren

der Digestion mit Chloroformwasser, vielmehr muss Jeder glauben, dass es sich um eine neue, von Kutscher aufgefundene Methode handelt.

Die Ausdrucksweise von Kutscher ist, meines Erachtens nach, darum besonders unglücklich gewählt, weil Kutscher nicht versäumt hat, mich zu citiren, wo er glaubt, eine abfällige Kritik an mir üben zu können. Dadurch kann der Eindruck entstehen, als ob Kutscher mich absichtlich nicht als Autor für die Chloroformwasser-Digestion nennt, weil sonst seine Untersuchungen als das erscheinen würden, wofür ich sie ansehe, nämlich als weiterer Ausbau älterer, hauptsächlich meiner Versuche, welcher erforderlich war, seitdem wir durch Kossel neue Anschauungen über die Constitution des Eiweisses gewonnen haben. Dass man mit diesem Verfahren auch Mikroorganismen auf Enzyme wird untersuchen können, wenn dieselben als Massenculturen vorhanden sind, ist allerdings klar, so klar und selbstverständlich, dass es eigentlich gar nicht erst gesagt zu werden brauchte.

Das zweite Enzym der Hefe, das aber möglicher Weise mit dem eiweisspaltenden identisch ist, ist das nucleinspaltende, das dritte, das Enzym, welches aus den Kohlehydraten der Hefe Zucker bildet, und zwar, wie ich jetzt sagen kann, nicht aus dem Gummi, sondern aus den anderen Kohlehydraten der Hefe, sei es nun nur aus dem Hefenglycogen», sei es auch aus der Cellulose. Möglicher Weise ist noch ein weiteres Ferment vorhanden, welches auf die sogenannten störenden Substanzen (d. h. die die Ausfällung der Xanthinbasen durch Silbersalze störenden) zerstörend wirkt. Sodann ist von Emil Fischer¹⁾ die Maltase (oder Glucase) in der Hefe aufgefunden. Endlich führen Hahn und Geret auch das Vorhandensein einer Oxydase an. Dabei ist der Zymase noch garnicht gedacht. Dass diese Fülle von Fermenten die Isolirung eines einzelnen fast aussichtslos erscheinen lässt, braucht kaum hervorgehoben zu werden.

¹⁾ Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. XXVIII, S. 1433. (1895).

Wir beurtheilen die Gegenwart oder Abwesenheit eines Enzyms nach seiner Wirkung, weil wir ein anderes Kriterium hierfür nicht haben.

Bei der Darstellung eines Enzyms reicht dieses Kriterium aber dann nicht mehr aus, wenn die Möglichkeit besteht, dass ein zweites oder drittes Enzym in unwirksam gewordenem Zustand vorhanden sein könnte. Ein durch Erhitzen oder sonstwie seiner specifischen Energie beraubtes, unwirksam gewordenes Enzympräparat hat, soweit wir wissen, dieselbe elementare Zusammensetzung, wie das wirksame, eine Enzymlösung zeigt, wenn sie durch Aufkochen oder auf einem anderen Wege unwirksam gemacht ist, dasselbe Verhalten zu Reagentien, wie vorher. Es ist nicht daran zu zweifeln, oder doch höchst wahrscheinlich, dass bei dem Uebergang eines Enzyms in die unwirksame Form intramolekulare Umlagerungen, Atomwanderungen im Molekül vor sich gehen, dass also auch chemisch ein wirksames Enzym ein anderer Körper ist, wie ein unwirksames, aber unsere Hilfsmittel sind zu grob, um diese Umwandlung auf einem anderen Wege als durch die Abnahme oder das Verschwinden der specifischen Wirksamkeit nachweisen zu können, namentlich ändern sich die Löslichkeitsverhältnisse nicht. Wenn man also ein Material bearbeitet, welches mehrere Enzyme enthält, so kann man nicht wissen, ob die Auszüge nicht mehrere Enzyme enthalten. Das ist auch dann nicht ausgeschlossen, wenn die Prüfung auf dieselben negative Resultate ergibt. Es ist ja wohl denkbar, dass es unter Umständen einmal möglich sein könnte, Fermente zu trennen, es liegen ja auch Versuche nach dieser Richtung hin vor, im Allgemeinen aber ist, wenn man aus einem mehrere Enzyme enthaltenden Material ein Enzym dargestellt zu haben glaubt, immer mit der Möglichkeit zu rechnen, dass diesen Enzymen andere in unwirksamer Form beigemischt sein können.