

# Chemische Untersuchungen über die Selbstgärung der Hefe.<sup>1)</sup>

Von  
Fr. Kutscher.

Aus dem physiologischen Institut in Marburg.  
Der Redaction zugegangen am 15. December 1900.

Eine sehr auffällige Erscheinung vollzieht sich an gewaschener lebender Hefe, sobald man grössere, feucht gehaltene Mengen derselben bei höherer Temperatur sich selbst überlässt. Sie entwickelt dann, auch bei Abwesenheit von Zucker, längere Zeit reichlich Alkohol und Kohlensäure. Diesen Process, bei dem die Hefe jene flüchtigen Spaltungsprodukte, die wir auch bei der Vergärung des Zuckers durch Hefe entstehen sehen, auf Kosten ihrer eigenen Leibessubstanz erzeugen muss, hat man als Selbstgärung bezeichnet.

Der Vorgang ist seit langer Zeit bekannt und von Thénard, Pasteur und anderen Forschern, namentlich aber von Béchamp und Schützenberger näher studirt worden.

Béchamp und Schützenberger erkannten bereits, dass sich die Selbstgärung aus 2 getrennt verlaufenden Vorgängen zusammensetzen muss, da es bei der Selbstgärung nicht bloss zur Bildung von Kohlensäure und Alkohol kommt. Denn sie beobachteten, wie sich mit dieser Erscheinung eine Reihe anderer chemischer Reactionen verbinden, durch die sich in der der Selbstgärung überlassenen Hefe weit mehr in Wasser lösliche, diffusible Substanzen bilden, wie in frischer Hefe vorhanden sind.

1) Dieser Arbeit ist der Preis der Külz-Althoff-Stiftung zuertheilt worden.

Als solche löslichen Substanzen wurde von Béchamp und Schützenberger ein dem Eiweiss nahesteher Körper, der die grösste Aehnlichkeit mit dem Hemialbumin besass, das Schützenberger erhielt, wenn er verdünnte, siedende Schwefelsäure auf Albumin einwirken liess, dargestellt. Weiter gewannen sie aus dem wässerigen Extract, der der Selbstgährung überlassenen Hefe Tyrosin, Leucin, Butalamine, ferner die Alloxurbasen, Carnin, Sarkin, Xanthin und Guanin. Alle diese Körper fasst Schützenberger als unmittelbare Derivate albuminoider Substanzen auf. Die Erklärung, die Schützenberger für das Auftreten der eben genannten Substanzen gibt, lasse ich wörtlich folgen. Er schreibt darüber in den Gährungserscheinungen Theil II, S. 266: Bei der Alkoholgährung wurde der Erscheinungen gedacht, die man an einer der Inanition überlassenen und feucht gehaltenen Hefe beobachtet: sie dürfen nur als wirkliche Verdauung von Protein-substanzen gedacht werden. Schützenberger fasst danach das Tyrosin, Leucin etc. als Verdauungsprodukte der Protein-substanzen auf.

Um das Vorstehende kurz und scharf auszudrücken, hebe ich hervor, dass wir auf Grund der Arbeiten Schützenberger's die Selbstgährung der Hefe als einen Vorgang auffassen können, bei dem erstens ein Abbau der Kohlehydrate, die den Leib der Hefe zusammensetzen, zu Kohlensäure und Alkohol erfolgt. Zweitens greift aber die Hefe bei der Selbstgährung ihren Eiweissbestand an und zersetzt das Albumin bis zur Bildung krystallinischer Produkte. Diese letzte Erscheinung fasst Schützenberger als Selbstverdauung auf.

Da ich selbst mich nur mit jenem Theil der Selbstgährung befasst habe, der eine Zersetzung stickstoffhaltiger Körpersubstanz zur Folge hat, so will ich im Nachfolgenden nur die hierauf bezüglichen Veröffentlichungen aufführen.

Die Arbeiten Schützenberger's wurden durch Kossel weiter fortgesetzt und wesentlich gefördert. Denn wir verdanken Kossel die wichtige Erklärung über die Herkunft der Sarkinbasen, welche Schützenberger als Derivate des Albumins auffasste. Kossel stellte diese irrige Annahme

Schützenberger's richtig, indem er nachwies, dass dieselben aus dem in der Hefe reichlich vorhandenen Nuclein, das bei der Selbstgährung sich zersetzt, hervorgehen. Ebenso erkannte er das Nuclein als diejenige Substanz, die durch ihren Zerfall die Phosphorsäure liefert, welche man in den Extracten der der Selbstgährung überlassenen Hefe in beträchtlicher Menge findet.

Später sind von Salkowski die Versuche Schützenberger's wieder aufgenommen worden. Salkowski modificirte die Methode, die Béchamp und Schützenberger benutzten, indem er an Stelle des Kreosotwassers, unter dem Béchamp und Schützenberger die der Selbstgährung überlassene Hefe hielten, Chloroformwasser benutzte. Bezüglich der stickstoffhaltigen löslichen Produkte, die er in den Extracten der unter Chloroformwasser gehaltenen Hefe fand, kam er zu denselben Resultaten wie Schützenberger und Kossel, indem er das Leucin und Tyrosin als Verdauungsprodukte von Proteinsubstanzen auffasste, die Alloxurbasen hingegen aus den Nucleinen der Hefe hervorgehen liess. Die Zahl der bei der Selbstgährung entstehenden löslichen und von Schützenberger isolirten Substanzen ist durch Salkowski nicht vermehrt worden.

Auf die Veröffentlichungen von Salkowski erfolgte lange keine Arbeit, die sich mit der Selbstgährung der Hefe befasste. Erst in letzter Zeit wurden von Hahn die Beobachtungen Schützenberger's und Kossel's auch auf den Hefepresssaft, der nach Buchner's Verfahren aus der Hefe gewonnen war, übertragen. Dabei beobachtete Hahn die gleichen Erscheinungen, wie Schützenberger und Kossel an der der Selbstgährung überlassenen Hefe. Das Eiweiss und die im Presssaft vorhandenen Nucleine werden sehr schnell angegriffen und vollkommen gespalten. Nach beendeter Zersetzung der genannten Körper fand er im Presssaft in reichlicher Menge Leucin und Tyrosin, freie Phosphorsäure und Nucleinbasen.

Damit glaube ich die wichtigsten Arbeiten, die die bei der Selbstgährung der Hefe erfolgende Spaltung ihrer Eiweisskörper und Nucleine verfolgen, aufgeführt zu haben.

Ich wende mich nunmehr meiner eigenen Arbeit zu, in deren Verlauf es mir gelang, eine Reihe wohl charakterisierter stickstoffhaltiger Substanzen zu isoliren, die man bisher noch nicht bei der Selbstgährung der Hefe beobachtet hat. Dieselben sind, wie ich später zeigen werde, wohl geeignet, um Aufschluss über die Natur des Verdauungsvorganges zu geben, unter dessen Wirkung gleichzeitig die schon Schützenberger bekannten stickstoffhaltigen, wasserlöslichen Substanzen bei der Selbstgährung sich bilden.

Die Methode, deren ich mich bei meiner Arbeit bediente, gestaltete sich allmählich folgendermassen:

Möglichst frische Brauereihefe wurde mit eiskaltem Wasser gewaschen, bis dasselbe farblos ablief. Darauf wurde sie nach der Angabe E. Fischer's unter Toluolwasser gebracht und bei ca. 38° C. sich selbst überlassen. Zunächst tritt eine lebhafte Gährung und Gasentwicklung ein, die bei den verschiedenen Proben verschieden lange Zeit währen kann, in der Regel aber nach 24—48 Stunden völlig erloschen ist. Jetzt beginnt die Hefe sich zu sedimentiren und nach einigen Tagen steht eine klare, deutlich sauer reagirende Flüssigkeit über einem dünnen Bodensatz der toten Hefezellen. Zunächst gibt die Flüssigkeit noch lebhafte Biuretreaction, doch verschwindet diese in ca. 8—14 Tagen vollkommen oder bis auf Spuren. Während man die Flüssigkeit ziemlich schnell frei von biuretgebender Substanz erhält, ist dies bei dem Rückstand nicht der Fall. Er gibt die Biuretreaction weit länger, und auch dann, wenn man ihn öfter aufrührt, gelingt es zuweilen nicht, einen Rückstand zu bekommen, der keine Biuretreaction mehr zeigt.

Ich habe derartige Proben nicht weiter verarbeitet, sondern nur solche benutzt, in denen sowohl Flüssigkeit wie Rückstand schnell von biuretgebender Substanz frei wurden, da ich hoffen konnte, in diesen Proben keine schmierigen Zwischenprodukte anzutreffen, welche die Isolirung der krystallinischen Verdauungsprodukte hindern mussten. Um genügend an den einzelnen Verdauungsprodukten zu erhalten, ist es nothwendig, mindestens 3—4 Liter frischer Hefe zu verarbeiten.

In meinem nachstehend geschilderten Hauptversuch benutzte ich 3 Liter einer frischen, untergährigen Hefe. Dieselbe bildete, als ich sie aus der Brauerei erhielt, eine Masse, die die Consistenz von dünnem Kleister besass. Sie liess sich leicht ohne grossen Verlust durch Decantation auswaschen. Nach dem Auswaschen liess ich die Hefe sich absetzen und schwenmte sie mit 5 Liter Toluolwasser in ein verschliessbares Gefäss, das bis zum Ablauf der Gasentwicklung nur leicht bedeckt im Brutschrank bei 38° C. stehen blieb. Darauf wurde es fest geschlossen und die Hefe unter öfterem Umschütteln so lange sich selbst überlassen, bis Flüssigkeit und Rückstand keine Biuretreaction mehr gaben.<sup>1)</sup> Danach liess ich in der Kälte absetzen, heberte die klare Flüssigkeit vom Bodensatz ab, wusch denselben dreimal mit Toluolwasser durch Decantation aus, vereinigte die erste Flüssigkeit mit dem Waschwasser und fällte das Ganze mit Barytwasser. Vom Baryumphosphat wurde abfiltrirt, das Filtrat durch Schwefelsäure annähernd vom überschüssigen Baryt befreit. Die Flüssigkeit wurde jetzt mit Essigsäure schwach angesäuert und stark concentrirt. Es schied sich zunächst Tyrosin in reichlicher Menge ab. Dieses wurde abgesaugt, mit möglichst wenig Wasser ausgewaschen und das neue Filtrat mit wenig verdünnter Salpetersäure versetzt. Darauf wurde ihm so lange 20% ige Silbernitratlösung zugefügt, als ein Niederschlag entstand. Von der sehr voluminösen Fällung wurde nach 48 Stunden abfiltrirt. Ich will diese Fällung als Fällung I, das Filtrat davon als Filtrat I bezeichnen.

#### Fällung I.

Die Fällung I musste die Alloxurbasen, welche bei der Selbstgährung der Hefe aus den Nucleinen hervorgehen, enthalten, und zwar in Form der schwer löslichen salpetersauren Silberverbindungen. Um dieselben in die salpetersäurefreien Silberverbindungen der Alloxurbasen überzuführen, schwenmte ich Fällung I in überschüssigem Ammoniakwasser auf, fügte demselben etwas ammoniakalische Silberlösung zu und brachte das Ganze in einen verschliessbaren Kolben, in dem ich es

<sup>1)</sup> Dies war nach 14 Tagen erreicht.

unter öfterem Umschütteln 48 Stunden hielt. Nach dieser Zeit wurde filtrirt. Das Filtrat gab gegen ammoniakalische Silberlösung keine Fällung. Der auf dem Filter verbleibende Rückstand musste demnach die Alloxurbasen enthalten. Ich will zunächst die Verarbeitung des die Alloxurbasen enthaltenden Rückstandes, danach die Behandlung der davon abgesaugten Flüssigkeit angeben.

### Rückstand.

Um aus dem Rückstand die Alloxurbasen zu isoliren, benutzte ich das in letzter Zeit von Krüger und Salomon angegebene Verfahren. Die auf dem Filter verbleibenden Silberverbindungen wurden mit Salzsäure zersetzt, vom Chlorsilber wurde abfiltrirt, das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in zwei Fractionen, die Xanthin- und Hypoxanthinfrac-tion, getrennt.

In der Xanthinfrac-tion war nur eine geringe Menge schmieriger Substanz hinterblieben, und alle meine Versuche, dieselbe nach den Angaben von Krüger und Salomon aufzulösen, scheiterten. Ich erhielt aus derselben weder Xanthin, noch sonst eine Base der Xanthinfrac-tion.

Die Hypoxanthinfrac-tion dagegen liess auf Zusatz von Ammoniak einen reichlichen Niederschlag fallen, aus dem sich reines salzsaures Guanin gewinnen liess, das auf Zusatz von  $\text{NH}_3$  die freie Base lieferte.

### Analyse:

0.127 g der freien Base lieferten bei der Verbrennung 50.4 ccm. N.  
T = 11° C., Ba 748 mm. Hg.

Für  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$

Berechnet  
N = 46.40%

Gefunden  
N = 46.60%

Das Filtrat von der Guaninfällung wurde mit Pikrinsäure versetzt. Die entstehende reichliche Fällung wurde sofort abgesaugt und aus Wasser umkrystallisirt. Da sich die Verbindung nicht wie das pikrinsaure Adenin in langen Nadeln, sondern körnigen Krystallwarzen abschied, wurde sie nochmals in siedendem Wasser gelöst und mit Thierkohle behandelt. Jetzt fiel sie in

langen verfilzten Nadeln aus. Ihre Analyse gab nachstehende Werthe.

0.1344 g der bei 120° C. bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Substanz gaben bei 11° C. 36.6 cem. Stickstoff.

Für  $C_5H_5N_5 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$

Berechnet	Gefunden
N = 30,77%	N = 31,3%

Die Mutterlaugen vom Adeninpikrat müssen den Rest der Alloxurbasen der Hypoxanthinfraktion enthalten. Sie wurden vereinigt, mit Schwefelsäure angesäuert, von der überschüssigen Pikrinsäure durch Benzol befreit und darauf mit Kupfersulfat und Natriumbisulfid gefällt. Die Fällung war eine geringe. Sie wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und eingeeengt, bestand aber nur aus etwas Adenin, das der ersten Fällung durch Pikrinsäure entgangen war. Heteroxanthin etc. liess sich auch nicht in Spuren nachweisen. Die Ausbeute an salzsaurem Guanin hatte 0,9 g, die an Adeninpikrat 1,40 g betragen. Eine nicht beträchtliche Menge Adenin habe ich dann noch in einer andern Fraction, als der eben beschriebenen, gefunden. Dasselbe war jedenfalls begleitet von Spuren von Guanin. Ich werde an gelegener Stelle hierauf zurückkommen.

Es hatten sich also in meinem Hauptversuch von den Alloxurbasen nur Guanin und Adenin isoliren lassen. Diese Verhältnisse werden sich wahrscheinlich nicht immer gleichmässig finden, sondern einem starken Wechsel unterworfen sein, je nachdem man die überlebenden Hefezellen oder die getödteten der Selbstgährung überlässt, ferner wird die Dauer der Selbstgährung und die Temperatur, bei der sie verläuft, nicht ohne Einfluss auf die bei der Selbstgährung sich bildenden und restirenden Alloxurkörper sein.

Wir verdanken die ersten Versuche, welche uns über diese Fragen aufklären, Viktor Lehmann, einem Schüler Kossel's. Derselbe konnte an überlebender, der Selbstgährung überlassener Hefe eine schnelle Abnahme der Alloxurkörper feststellen. Das Gleiche hat dann auch Salkowski an Hefe, die er unter Chloroformwasser hielt, und Hahn am Hefepresssaft nachweisen können. Ob die Alloxurkörper schliesslich

vollkommen bei der Selbstgährung vernichtet werden. darüber liefern uns die Versuche von Lehmann, Salkowski und Hahn keinen Aufschluss. Auch mein Versuch, in dem ich Hefe so lange der Selbstgährung überliess, bis die biuretgebende Substanz in ihr vollkommen zersetzt war, gibt keine endgültige Antwort auf die aufgeworfene Frage, da ich ebenfalls noch Alloxurkörper nachweisen konnte. Allerdings scheint aus meinem Versuch hervorzugehen, dass die Basen der Xanthin-fraction wenigstens, bei der Selbstgährung der Hefe vollkommen zersetzt werden können. Im Uebrigen steht der Befund der von mir an der Hefe bezüglich des Verhaltens der Alloxurbasen gegen eine energische und lange fortgesetzte Selbstgährung erhoben worden ist, in guter Uebereinstimmung mit den Beobachtungen, die ich bei der Selbstverdauung des Pankreas machen konnte. Auch hierbei werden bekanntlich die Alloxurbasen frei und darauf wahrscheinlich zersetzt. Als Hauptmasse der restirenden Alloxurbasen fand ich, genau wie bei meinem Versuche mit der Hefe, bei der Selbstverdauung des Pankreas Guanin und Adenin.

#### Filtrat.

Das stark ammoniakalische Filtrat von dem Rückstand, der mir das Adenin und Guanin geliefert hatte, stumpfte ich mit Salpetersäure bis zur schwach ammoniakalischen Reaction ab. Es entstand dabei ein reichlicher Niederschlag. Derselbe wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen, darauf in Wasser fein vertheilt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom Schwefelsilber wurde abfiltrirt, das Filtrat bei mässiger Temperatur auf ca. 500 cem. gebracht, mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der reichliche Niederschlag wurde abfiltrirt, mit verdünnter Schwefelsäure ausgewaschen und mit Baryt zersetzt. Das Filtrat vom phosphorwolframsauren Baryt wurde zunächst durch Kohlensäure von dem überschüssigen Baryt befreit, eingeeengt und die letzten Mengen des Baryts, der sich durch Kohlensäure nicht ganz hatte abscheiden lassen, durch Schwefelsäure herausgeschafft. Die barytfreie Flüssigkeit wurde zum dünnen Syrup



eingeeengt. Nach einiger Zeit schied sich aus demselben eine zu Drusen vereinigte, in kleinen Nadeln krystallisirende Substanz ab. Dieselbe fiel, nachdem sie einmal aus Wasser umkrystallisirt war, nicht mehr mit Silbernitrat bei saurer Reaction, auch bei neutraler Reaction des Lösungsmittels wurde sie durch Silbernitrat nicht niedergeschlagen. Sie musste also nur in die Fraction der Alloxurbasen mitgerissen worden sein. Ammoniakalische Silberlösung dagegen erzeugte mit ihr eine reichliche Fällung, die sehr leicht in Salpetersäure und überschüssigem Ammoniak löslich war. Behandelte man ein wenig von dem Körper mit verdünnter siedender Salpetersäure, so lieferte er jetzt auch bei stark saurer Reaction der Flüssigkeit mit Silbernitrat eine reichliche, amorphe Fällung, die sich in siedender Salpetersäure löste und nach dem Erkalten in feinen Nadeln ausfiel. Der Körper reagirte gegen Lakmus neutral und gab bei der Analyse nachstehende Werthe:

0.1176 g der bei 130° C. getrockneten Substanz gaben bei der Verbrennung 26.0 ccm. Stickstoff. T = 11.5° C., Bar. 745 mm. Es entspricht das 25.84% N.

0.1472 g gaben bei der Verbrennung 0.0336 g Wasser und 0.233 g Kohlensäure. Daraus berechnen sich 2.55% H und 43.18% C.

0.1412 g gaben bei der Verbrennung 0.0327 g Wasser und 0.223 g Kohlensäure. Daraus berechnen sich 2.60% H und 43.08% C.

Berechne ich aus den gefundenen Werthen den einfachsten Formelausdruck, so würde dem analysirten Körper die Formel  $C_5H_6N_4O_4$  zukommen.

Berechnet	Für $C_5H_6N_4O_4$	
	Gefunden	
	I	II
C = 43.24%	43.18%	43.08%
H = 2.7%	2.55%	2.6%
N = 25.23%	25.84%	

Das Filtrat der Phosphorwolframfällung, die mir den eben geschilderten Körper geliefert hatte, wurde von mir ebenfalls untersucht, doch kam ich nach Entfernung der überschüssigen Phosphorwolframsäure nur zu einem Syrup, der sich nicht weiter zugänglich erwies.

### **Filtrat I.**

Ich wende mich nunmehr dem Filtrat I wieder zu, d. h. der Flüssigkeit, die man erhält, wenn man nach Abscheidung des Tyrosins die Verdauungsflüssigkeit der Hefe zur Gewinnung der Alloxurbasen bei schwach salpetersaurer Reaction mit Silbernitrat fällt und die Fällung abfiltrirt. Diesem fügte ich noch soviel einer 20%igen Silbernitratlösung zu, bis eine Probe gegen Barytwasser nicht nur weisse organische Silberverbindungen, sondern gleichzeitig braunes Silberoxyd fallen liess. Nunmehr gab ich vorsichtig gesättigte kalte Barytlösung so lange zu, bis eine von dem reichlich entstehenden Niederschlag klar filtrirte Probe mit ammoniakalischer Silberlösung nur mehr eine schwache Trübung erzeugte. Die starke Fällung, die sich auf diese Weise erzielen liess, wurde abfiltrirt. Ich will diese Fällung als Fällung II und das Filtrat davon als Filtrat II bezeichnen.

In Fällung II müssen, wenn man in der Weise, wie eben angegeben ist, verfährt, alle diejenigen löslichen Substanzen, bis auf geringe Reste, hineingehen, welche sich auch durch ammoniakalische Silberlösung niederschlagen lassen würden. Doch gewährt das von mir benutzte Verfahren den Vortheil, dass das Filtrat von der Fällung II ammoniakfrei bleibt. Um das in Fällung II steckende Gemenge verschiedener Körper aufzuthemen, verfuhr ich folgendermassen:

### **Fällung II.**

Fällung II wurde gut ausgewaschen, darauf in Wasser vertheilt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom Schwefelsilber wurde abfiltrirt, das neue Filtrat bei mässiger Temperatur auf ca. 500 ccm. gebracht, mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt.

### **Phosphorwolframfällung.**

Die Phosphorwolframverbindungen werden durch Baryt zersetzt und nach Abscheidung des überschüssigen Baryts durch Kohlensäure die freien Basen durch ammoniakalische Silberlösung vorsichtig ausgefällt. Die Silberverbindungen wurden mit HCl zersetzt und bei geringer Temperatur die erhaltenen

Flüssigkeiten zum dünnen Syrup eingeengt. Sehr bald krystallisirt meist gleich nach dem Erkalten in kleinen Drusen eine Substanz, die von mir zuerst als salzsaures Histidin angesprochen wurde und die ich bei allen meinen Verdauungsversuchen erhalten habe. Die Ausbeute war eine schwankende, stets aber geringe, so dass ich zur Analyse die in meinen früheren Versuchen erhaltenen Mengen der im Hauptversuch gewonnenen Substanz zufügen musste. Trotzdem verfügte ich schliesslich nur über ca. 0,5 g Substanz. Ich versuchte zunächst dieselbe durch eine Chlorbestimmung zu identificiren. Zu diesem Zwecke löste ich 0,154 g Substanz, die bei 110° C. nichts an Gewicht verloren hatte, in Wasser, fügte Salpetersäure zu und gab Silbernitrat bei. Der reichlich entstandene Niederschlag war gallertig, wie man ihn von Alloxurbasen erhält, und nicht lichtempfindlich. Eine kleine Probe erwies sich in überschüssigem Ammoniak unlöslich, löslich dagegen in siedender Salpetersäure, aus der er beim Erkalten in Nadeln wieder ausfiel. Danach lag eine Alloxurbase vor, die mit in die Fällung II gerathen war. Um festzustellen, welche derselben es sei, krystallisirte ich die amorphe Silberverbindung, die ich aus den 0,154 g erhalten, aus siedender Salpetersäure, der ich ein wenig Harnstoff beigefügt hatte, um. Die Silberverbindung wurde abfiltrirt, im Vacuum getrocknet und das Silber bestimmt.

0,1524 g gaben 0,061 g Silber d. h. 40,03%.

Die gefundene hohe Silberzahl sprach dafür, dass die Silberverbindung des Adenins vorlag, welche bekanntlich ein Gemenge von  $C_5H_5N_5 \cdot AgNO_3$  und  $C_5H_5N_5 \cdot 2AgNO_3$  ist. Davon würde  $C_5H_5N_5 \cdot AgNO_3 = 35,41\%$  Ag,  $C_5H_5N_5 \cdot 2AgNO_3 = 45,47\%$  Ag verlangen.

Um endgültig festzustellen, welche Alloxurbase hier vorlag, führte ich den Rest der mir verbliebenen salzsauren Verbindung durch Ammoniak in die freie Base über.

Davon gaben 0,1196 g bei der Verbrennung 51,0 cem. Stickstoff bei  $T = 10^\circ C.$ , Bar. 750 mm.

Für  $C_5H_5N_5$

Berechnet  
N = 51,89%

Gefunden  
N = 50,60%

Trotzdem der von mir gefundene Stickstoffwerth merklich hinter dem berechneten zurückblieb, glaube ich doch, die von mir analysirte Verbindung als Adenin ansprechen zu dürfen, das mit einer anderen stickstoffärmeren Alluxarbase (wahrscheinlich Guanin) verunreinigt war. Dass in Wirklichkeit Guanin oder Xanthin der von mir analysirten Base beigemischt war, zeigte sich, als ich mit ihr die Weidel'sche Reaction anstellte. Sie gab dabei eine deutliche Rothfärbung.

Die Mutterlauge von der eben geschilderten Substanz erwies sich lange Zeit sehr spröde und wollte von krystallinischen Körpern nichts hergeben, bis ich schliesslich den schmierigen Syrup, den sie bildete, mit concentrirter Salzsäure aufnahm und über Schwefelsäure langsam eindunsten liess. Bei dieser Behandlung verwandelte sie sich in eine feste, aus grossen glänzenden Krystallen zusammengesetzte Masse. Die letzten Schmierer liessen sich durch etwas concentrirte Salzsäure, in der die Krystalle nur wenig löslich waren, von denselben abspülen. Die Krystalle wurden darauf mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vacuum getrocknet. Eine Chlorbestimmung derselben gab nachstehendes Resultat:

0.1542 g gaben 0.193 g AgCl.

Für  $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2 HCl$

Berechnet	Gefunden
C = 31.14%	C = 31.0%

Nach dieser Analyse lag das Histidindichlorid vor.

Um ganz sicher die Verbindung als eine Histidinverbindung zu erweisen, führte ich einen Theil derselben wieder in die Silberverbindung über. Dieselbe wurde im Vacuum zur Gewichtconstanz gebracht und eine Silber- und Stickstoffbestimmung in ihr vorgenommen.

Es gaben 0.1236 g an Silber 0,0686.

0.119 g sättigten, nach Kjeldahl behandelt, 9.1 ccm.  $\frac{1}{10}$  N.-Oxal.

Für  $C_6H_7Ag_2N_3O_2 + H_2O$

Berechnet	Gefunden
Ag = 55.81%	Ag = 55.50%
N = 10.85%	N = 10.72%

Die Ausbeute an Histidindichlorid betrug ca. 0.8 g.

### Das Filtrat der Phosphorwolframfällung.

Das Filtrat der Phosphorwolframfällung wurde durch Baryt von der überschüssigen Phosphorwolframsäure und durch Schwefelsäure genau vom Baryt befreit. Danach wurde zum Syrup eingeengt. Derselbe reagierte stark sauer und erstarrte in meinem Hauptversuch zu einem weichen Krystallbrei. Um denselben in seine einzelnen Bestandtheile zu zerlegen, nahm ich ihn von Neuem mit Wasser auf und übersättigte ihn siedend heiss mit Zinkoxyd. Ich habe an anderer Stelle nachgewiesen, dass es leicht gelingt, durch das Zinksalz Asparaginsäure und Glutaminsäure, die ich in dem vorliegenden Falle unter den in die Silberfällung eingegangenen Säuren vermuthete, zu trennen, denn die Glutaminsäure bildet ein in Wasser sehr schwer lösliches, gut krystallisirendes Salz, während das asparaginsaure Zink leicht löslich und nicht krystallisirbar ist. Um also aus dem Säuregemenge die Glutaminsäure zunächst abzuschneiden, fügte ich demselben Zinkoxyd im Ueberschuss zu. Nach 48 Stunden wurde filtrirt, der auf dem Filter verbliebene Rückstand, der neben dem ungelösten Zink auch das glutaminsaure Zink enthalten musste, wurde in Essigsäure gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Es liess sich aber schliesslich nur eine geringe Menge stark gefärbter Schmiere gewinnen. Aus derselben vermöchte ich auf keine Weise Glutaminsäure darzustellen. Auch schon in zwei Vorversuchen, in denen ich die Trennung von Asparagin- und Glutaminsäure noch nach dem unvollkommeneren Verfahren von Ritthausen versucht hatte, war es mir nicht geglückt, Glutaminsäure unter den Produkten der Selbstgährung der Hefe aufzufinden. Doch möchte ich mich noch nicht endgültig dahin äussern, dass Glutaminsäure bei der Selbstgährung der Hefe nicht entsteht, wenn es mir auch nach meinem letzten Versuch wahrscheinlich ist.

Das mit Zink gesättigte Gemenge der Säuren wurde nunmehr zunächst durch Schwefelwasserstoff vom Zink befreit und darauf mit kohlensaurem Kupfer in der Siedehitze gesättigt. Nach genügender Concentration schied sich in Masse das

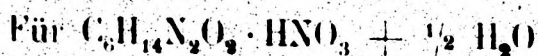
charakteristische schwer lösliche Kupfersalz der Asparaginsäure ab. Es wurden gewonnen 6.2 g lufttrockenes Kupfersalz. Die Mutterlauge des asparaginsäuren Kupfers war nach der vollkommenen Abscheidung des asparaginsäuren Kupfers nicht mehr blau, sondern grün gefärbt. Sie lieferte nach der Entkupferung einen stark sauren Syrup, der keine Neigung zur Krystallisation zeigte.

#### Filtrat II.

Filtrat II wurde nach Zugabe von etwas Silbernitratlösung mit Baryt gesättigt. Der entstehende Niederschlag, Fällung III, wurde abfiltrirt, mit Barytwasser gewaschen, darauf in Wasser aufgeschwemmt und nach Zufügung von etwas Schwefelsäure mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom Schwefelsilber wurde abfiltrirt, das Filtrat wurde von der Schwefelsäure durch Baryt befreit, danach mit Salpetersäure genau neutralisirt und zum dünnen Syrup eingeeengt. Derselbe krystallisirte bis auf den letzten Tropfen. Die Krystallisation bestand aus neutralem rechtsdrehendem Argininitrat.

#### Analyse.

0.294 g der im Vacuum getrockneten Substanz gaben bei der Verbrennung 72.0 ccm. N bei 13° C. und 742 mm. Ba. Als Sperrflüssigkeit diente 25%ige Kalilauge.



Berechnet	Gefunden
N = 28.45%	N = 28.31%

Aus 3 Liter Hefe liess sich ca. 12 g reines Argininitrat gewinnen.

#### Filtrat III.

Das Filtrat von Fällung III wurde in der Kälte durch Zugabe von Schwefelsäure vom Baryt und durch Salzsäure vom Silber befreit. Darauf wurde es mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die sehr reichliche Fällung wurde abgesaugt, mit 5%iger Schwefelsäure sorgfältig gewaschen und mit Baryt zersetzt. Von den unlöslichen Barytverbindungen wurde abfiltrirt, das Filtrat durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit, zum dünnen Syrup eingeeengt, und derselbe nach den Angaben

Kossel's mit Pikrinsäure behandelt. Das abgeschiedene Pikrat war, wie die Analyse ergab, Lysinpikrat. Die Ausbeute war eine sehr reichliche. Sie betrug für 3 Liter Hefe ca. 14 g reines Lysinpikrat.

Analyse.

Es gaben 0.223 g der über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Substanz bei der Verbrennung 0,089 g Wasser und 0.313 g Kohlensäure.

Für  $C_8H_{14}N_2O_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$ .

Berechnet	Gefunden
H == 4,53%	H == 4,47%
C == 38,40%	C == 38,30%

In 2 getrennten Versuchen überzeugte ich mich weiter von der Bildung von Ammoniak während der Selbstgärung, indem ich einen Theil der klar filtrirten Flüssigkeit, in der sich die Selbstgärung vollzogen hatte, mit Baryt resp. Magnesia destillirte. In beiden Fällen wurde Ammoniak übergetrieben, doch ist die Destillation mit Baryt vorzuziehen, da einer Bildung von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia vorgebeugt wird.

Es hatten sich also neben den bisher bekannten stickstoffhaltigen Substanzen, die bei der Selbstgärung der Hefe sich bilden, den Sarkinbasen, dem Leucin, dem Tyrosin, noch Ammoniak, Histidin, Arginin, Lysin, Asparaginsäure und eine Substanz der Formel  $C_8H_6N_4O_4$  nachweisen lassen. Zu den gleichen Resultaten kam ich, wenn ich die Flüssigkeit, in der die Selbstgärung stattfand, durch Zugabe von Natriumcarbonat schwach alkalisch hielt.

Von den aufgezählten Spaltungsprodukten, die bei der Selbstgärung durch Verdauung der Proteinsubstanzen entstehen, ist aber besonders das Auftreten der Hexonbasen charakteristisch für die Wirkungsweise eines Enzyms, das bei der Selbstgärung der Hefe thätig sein muss, nämlich für das Trypsin.

Dass ein proteolytisches Enzym in der Hefe vorhanden ist, ergaben schon die Versuche von Béchamp und Schützenberger, in denen dieselben die Hefe mit Kreosotwasser digerirten, also die Hefe abtödteten, dabei aber eine reichliche Spaltung der in der Hefe befindlichen Eiweisskörper erhielten.

Ein gleiches Resultat erzielte Salkowski, wenn er die durch Chloroformwasser getödtete Hefe sich selbst überliess. Damit war zur Genüge das Vorhandensein eines proteolytischen Enzyms in der Hefe dargethan. Nur die Frage nach der Natur desselben blieb noch offen, dieselbe konnte von den bisherigen Untersuchern nicht festgestellt werden, weil dieselben charakteristische Spaltungsprodukte, die das Enzym aus dem Eiweiss erzeugte, nicht in Händen hatten. Erst mir ist es, Dank der von Kossel ausgearbeiteten Methoden, gelungen, solche in den Hexonbasen darzustellen.

Ich will jedoch, bevor ich den Schluss ziehe, dass in der Hefe ein dem Trypsin der Warmblüter analoges oder sehr ähnliches Enzym vorhanden ist, etwas näher auf die Natur und Wirkungsweise des proteolytischen Enzyms des Pankreas, das wir Trypsin nennen, eingehen. Rasch und leicht würde es uns möglich sein, ein Enzym als Trypsin zu identificiren, wenn wir über Methoden verfügten, die gestatteten, das Trypsin in absoluter Reinheit zu isoliren. Dann würde uns die Elementaranalyse die weitere Identificirung ohne Mühe gestatten. Ueber die Methoden, die man zur Reindarstellung des Trypsins ausgearbeitet hat, und die Körper, welche man mit ihrer Hülfe als Trypsin isolirt hat, kann ich hier wohl hinweggehen, sie haben Produkte, die einer strengen wissenschaftlichen Prüfung standhalten würden, nicht geliefert.

Wir sind daher nach wie vor darauf angewiesen, zur Identificirung des Trypsins auf seine Wirkungsweise zurückzugreifen. Nun haben unsere Ansichten über die Wirkungsweise des Trypsins recht tiefgehende Wandlungen erfahren. Corvisart und Claude Bernard, die ersten, die die Wirkungsweise des Trypsins näher studirten, ertheilten demselben kaum eine andere Rolle als dem proteolytischen Enzym des Magensaftes, dem Pepsin. Nach ihnen wurden durch das Trypsin die unlöslichen Eiweisskörper der Nahrung verflüssigt und in diffusible Form gebracht, damit endete für sie die Wirkung des Trypsins auf das Eiweiss.

Durch Kühne wurden unsere Kenntnisse über das Trypsin wesentlich erweitert. Wir erfuhren durch ihn, dass



durch das Trypsin die Spaltung der Eiweisskörper viel weiter geht, als Corvisart und Claude Bernard annahmen. Denn in einwandfreien, die Fäulniss ausschliessenden Versuchen bewies er, wie die Eiweisskörper unter der Einwirkung des Trypsins bis zur Bildung von Leucin und Tyrosin gespalten werden. Den grossen, nicht krystallisirbaren Rest, der nach der Abscheidung des Leucins und Tyrosins von den der Trypsinverdauung unterworfenen Eiweisskörpern verblieb, fasste Kühne als eine peptonartige Substanz auf, die aus einer besonders widerstandsfähigen Gruppe des Eiweissmoleküls der Antigruppe hervorgehen sollte. Kühne nannte deswegen jene Substanz Antipepton. Mit den Entdeckungen Kühne's waren charakteristische Spaltungsprodukte des Trypsins bekannt geworden und man bezeichnete damals mit Recht ein Enzym, unter dessen Einwirkung sich Leucin, Tyrosin und Antipepton aus den Eiweisskörpern abspalteten, als ein tryptisches. In letzter Zeit habe ich jedoch zeigen können, dass die Wirkungsweise des Trypsins eine andere ist, als sie Kühne angenommen hat. Denn die Voraussetzung von einer gegen Trypsin widerstandsfähigen Gruppe im Eiweissmolekül erwies sich als irrig und das Antipepton liess sich in verschiedene krystallisirbare Substanzen auflösen.

Quantitative Versuche ergaben, dass bei der tryptischen Verdauung die gleichen Spaltungsprodukte in der Menge aus dem Eiweiss hervorgehen, wie bei der Spaltung der Eiweisskörper durch siedende starke Schwefelsäure. Unseren erweiterten Kenntnissen über die Wirkungsweise des Trypsins müssen wir zur Zeit bei der Identificirung eines Enzyms Rechnung tragen. Wir können uns daher nicht mehr begnügen, Leucin und Tyrosin zu isoliren, um ein Enzym als tryptisches zu charakterisiren, sondern wir müssen auch wohl oder übel die übrigen Spaltungsprodukte, die erkennen lassen, dass die Spaltung der Eiweisskörper durch das untersuchte Enzym wie unter dem Einfluss siedender starker Schwefelsäure erfolgt, darstellen.

Nehmen wir diese schärfere Forderung zum Maassstab für die Identificirung des Trypsins, dann schrumpft das Ver-

breitungsgebiet des Trypsins wesentlich zusammen. So müssen wir z. B. den Bakterien, denen man bisher häufig das Vermögen, tryptisches Enzym zu produciren, zugesprochen hat, dieses absprechen. Wohl erzeugen die Bakterien Enzyme, die das Eiweiss unter Bildung von Leucin, Tyrosin, Ammoniak zu spalten vermögen, aber daneben treten dann meist Indol und Skatol auf, Körper, welche als besonders charakteristische Spaltungsprodukte aus dem Eiweiss, unter Einwirkung von schmelzendem Kali, gleichzeitig mit Ammoniak, Leucin und Tyrosin hervorgehen.

Danach scheint bei den Bakterien ein proteolytisches Enzym weit verbreitet zu sein, das das Eiweiss nach Art des schmelzenden Kalis zersetzt. Das Trypsin dagegen wirkt auf das Eiweiss wie eine starke siedende Säure ein. Unter den charakteristischen tryptischen Verdauungsprodukten tritt daher niemals Indol und Skatol, sondern die Hexonbasen, weiter Asparaginsäure und Glutaminsäure auf, und bis es nicht gelungen ist, die letztgenannten Spaltungsprodukte neben Ammoniak, Leucin, Tyrosin als Abbauprodukte des Eiweisses durch Bakterienenzyme nachzuweisen, müssen wir das Vorhandensein tryptischer Bakterienenzyme als mindestens zweifelhaft betrachten.

Es fragt sich nun, ob im Gegensatz zu den Bakterienenzymen das proteolytische Enzym der Hefe das Gleiche leistet, wie das thierische Trypsin. Diese Frage müssen wir unbedingt mit ja beantworten. Denn hier wie dort sehen wir unter der Wirkung des Enzyms das Eiweiss schnell zerfallen und eine Reihe Produkte liefern, wie sie aus dem Eiweiss bei Behandlung mit starker siedender Schwefelsäure hervorgehen: so lange uns also nur die Wirkungsweise der beiden Enzyme zur Identificirung bleibt, so lange müssen wir das proteolytische Enzym der Hefe als ein Trypsin betrachten, das dem thierischen ausserordentlich nahe steht.

Die physiologische Bedeutung der vorstehenden Beobachtungen, die erweisen, dass die einfache, frei lebende, pflanzliche Zelle ein proteolytisches Enzym bildet, welches dem Trypsin der Warmblüter identisch oder ausserordentlich nahe verwandt ist, ist klar.

Aber auch klinisch scheinen mir die erhaltenen Resultate einiges Interesse zu verdienen, denn sie geben die Möglichkeit, bei Erkrankungen des Pankreas, welche eine Störung in der Absonderung des tryptischen Enzyms bedingen, das Trypsin zu ersetzen, indem man den Kranken Hefe oder Hefepresssaft reicht.

Des Weiteren habe ich untersucht, ob unter normalen Verhältnissen, wie sie beim Brauprocess herrschen, an der Hefe Vorgänge, die zu einem Abbau stickstoffhaltiger Körperbestandtheile bis zu den vorher genannten krystallinischen Substanzen führen, sich beobachten lassen.

Es war mir nun schon aufgefallen, dass ich in den Extracten, die ich aus der frischen, wohl genährten Hefe durch Auskochen mit Wasser gewann, in den meisten Fällen nur Körper vom Charakter der Propeptone und Peptone nachweisen konnte, während ich höchst selten Tyrosin, Leucin, sowie die Hexonbasen in minimalen Mengen erhielt. Diese Versuche liessen bereits vermuthen, dass das Hefetrypsin in der gut genährten Hefe anders wirken müsse wie in der Hungerhefe. Die Untersuchung des Bieres, in das ja ebenso wie Alkohol und Kohlensäure auch die aus der Körpersubstanz der Hefe stammenden Abbauprodukte hineingehen müssen, bestätigten die an der gut genährten Hefe gewonnenen Resultate vollkommen. Denn es gelang mir in keinem Fall (ich untersuchte Lagerbier einer hiesigen Brauerei), im Bier die so charakteristischen stickstoffhaltigen Abbauprodukte der Hungerhefe nachzuweisen.

Wie erklären sich nun diese Befunde? Man könnte annehmen, dass in der gut genährten Hefe das Hefetrypsin nur als Zymogen, im Hungerzustande aber die wirksame Form erzeugt würde, das die Körpersubstanz der Hefe anzugreifen vermag. Dagegen sprechen jedoch die Beobachtungen, die man sonst an hungernden Organismen machen kann. Wir sehen bei ihnen im Gegentheil die Absonderung der proteolytischen Enzyme, mögen dieselben als Zymogen oder als wirksames Enzym abgesondert werden, zurückgehen oder ganz aufhören.

Mir scheint daher eine andere Voraussetzung, die Differenzen, welche man zwischen den Extractivstoffen der Hungerhefe und der gut genährten Hefe bemerkt, sowie das Fehlen

von Tyrosin, Leucin etc. im Biere, ungezwungener zu erklären. Danach wäre anzunehmen, dass sowohl die gut genährte Hefe wie die Hungerhefe das freie Enzym erzeugen. Bei der unter günstigen Bedingungen befindlichen Hefe wirkt das Enzym jedoch auf die in das Innere der Zelle diffundierten, von den proteolytischen Enzymen des Malzes bereits vorbereiteten stickstoffhaltigen Nährstoffe und verändert dieselben so weit, dass sie die Hefe zum Aufbau ihrer Leibessubstanz verwerthen kann. Das Enzym wirkt hier also, um mich kurz auszudrücken, als **construierendes Enzym**. Bei der Hungerhefe dagegen, bei der todt stickstoffhaltige Nährstoffe nicht vorhanden sind, greift das Enzym schliesslich auch die lebende Zellsubstanz an und zerstört dieselbe, es wirkt also bei Hungerhefe als **destruierendes Enzym**.

#### Litteraturverzeichniss.

1. Thénard, Annales de chimie. T. 46.
2. Pasteur, Annales de chimie et phys. T. 58.
3. Schützenberger, Bulletin de la société chimique de Paris. T. 21, 1874, S. 194 u. 204; weiter Die Gährungserscheinungen 1876.
4. Kossel, Diese Zeitschrift Bd. III, S. 284, Bd. IV, S. 291, Bd. V, S. 251 u. 265.
5. Salkowski, Diese Zeitschrift Bd. XIII, S. 506; Zeitschr. f. klin. Medecin Bd. 17, Suppl.; Centralbl. f. d. med. Wissenschaft 1889, Nr. 13.
6. Hahn, Berichte d. deutsch. chemisch. Gesellsch. Jahrg. 31 I, 200. Gerel u. Hahn; Ber. d. deutsch. chemisch. Gesellsch. Jahrg. 31 I, 202. Gerel u. Hahn; Ber. d. deutsch. chemisch. Gesellsch. Jahrg. 31 II, 2335.
7. Krüger u. Salomon, Diese Zeitschrift Bd. XXVI, S. 350.
8. Victor Lehman, Diese Zeitschrift Bd. IX, S. 563.
9. Kutscher, Die Endprodukte der Trypsinverdauung: Sitzungsberichte der Gesellschaft zur Beförderung der ges. Naturwissenschaften Juni 1900 u. November 1900.
10. Corvisart, Sur une fonction peu connue du Pancréas. Paris 1857—1858.
11. Claude Bernard, Mémoire sur le Pancréas et sur le rôle du suc pancréatique. Paris 1856.
12. Kühne, Verhandl. des naturhist.-med. Vereins zu Heidelberg. N. F. Bd. 1, Jahrg. 1877, S. 190 u. 236; Zeitschrift f. Biologie Bd. 19, S. 164.
13. Fr. Weiss, Diese Zeitschrift Bd. XXXI, S. 79. W. bespricht auch kurz die früheren Arbeiten über die proteolytischen Enzyme des Malzes, so die von Windisch und Schellhorn.