

Ueber Hefegummi und Invertin.

Von

K. Oshima aus Sapporo in Japan.

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

(Der Redaction zugegangen am 4. Juli 1902.)

Dass die bisher dargestellten Invertinpräparate mit löslichem Gummi verunreinigt sind, ist durch die Untersuchung von E. Salkowski¹⁾ erwiesen worden.

Auf Veranlassung desselben habe ich die chemische Natur des Hefegummis aufs Neue untersucht und versucht, zu einem von Hefegummi freien Invertin zu gelangen.

I. Hefegummi.

Die Darstellung desselben geschah nach dem von E. Salkowski²⁾ angegebenen Verfahren aus amylnumfreier Presshefe. Ich erhielt dasselbe als feines weisses, fast aschefreies Pulver, das sich sehr leicht in Wasser löste.

1. Destillation mit Salzsäure.

Die Destillation mit Salzsäure von 1,060 D lieferte ein wasserhelles Destillat, welches mit essigsauerm Anilin keine Furfurolreaction gab. Mit wenig Phloroglucin und dem gleichen Volumen Salzsäure 1,19 D wurde es aber gelbroth und zeigte bei der spectroscopischen Untersuchung den für das Methylfurfurolphloroglucid nach Tollens³⁾ und mir charakteristischen Absorptionsstreifen im Anfang des Blau. Die Gegenwart eines Methylpentosans im Gummi ist danach nicht zu bezweifeln, wenn die Beimischung auch sehr gering zu sein scheint.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 306.

2) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 27, S. 499 (1894).

3) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 34, S. 1425.

2. Hydrolyse mit Schwefelsäure.

2 Portionen von 4 und 8 g Hefegummi wurden durch 6-stündiges Erhitzen mit 5% iger Schwefelsäure im Wasserbad am Rückflusskühler hydrolysiert. Gummi war nach dieser Zeit in der Lösung mit Fehling'scher Lösung + Natronlauge nicht mehr nachweisbar. Aus dem nach dem Entfernen der Schwefelsäure erhaltenen Sirup konnte ich keine Krystallisation erhalten, auch nicht nach Impfung von Antheilen des Sirups mit Fucose, Rhamnose, Mannose, dagegen schied sich entsprechend den Angaben von E. Salkowski (l. c.) leicht ein Hydrazon aus bei Zusatz von Phenylhydrazin.

In einem Falle wurden 2 g des concentrirten Sirups mit 2 g Wasser und 1 g Phenylhydrazin vermischt. Nach 10 Minuten fing die Krystallbildung an, nach 20 Minuten war die ganze Flüssigkeit zu einem Krystallbrei erstarrt.

In einem anderen Falle wurden 5 g des Sirups mit 5 g Wasser und 2,5 g Phenylhydrazin gemischt, das Gemisch 24 Stunden lang stehen gelassen, dann abgesogen und mit kaltem Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde 1 1/2 Stunden lang im Wasserbad erhitzt: es schied sich eine kleine Menge Osazon aus, die nach dem Abkühlen abfiltrirt und ausgewaschen wurde.

Das rohe Hydrazon, welches gegen 185° schmolz, wurde mit einer relativ grossen Quantität von 93% igem Alkohol erhitzt und heiss filtrirt. Das in starkem Alkohol unlösliche Hydrazon wurde aus ca. 45% igem Alkohol umkrystallisirt. Es war jetzt weiss, glänzend und nach der mikroskopischen Untersuchung nur aus rhombischen Täfelchen bestehend. Der Schmelzpunkt lag bei 196°: in 25% iger Salzsäure gelöst, drehte es links. 5 g dieses Hydrazons wurden mit 3 g Benzaldehyd, 20 g Wasser und 10 g Alkohol gemischt und eine Stunde lang am Rückflusskühler im Wasserbad erhitzt und nach der Abkühlung vom Benzaldehydphenylhydrazon abfiltrirt, das Filtrat wurde nochmals mit Aether ausgeschüttelt, mit Thierkohle entfärbt, langsam eingedampft, schliesslich im Schwefelsäure-

Exsiccator stehen gelassen. Eine Probe des Sirups zeigte nach Impfung mit Mannose nach 16 Stunden Krystallisation, nach 24 Stunden war die ganze Quantität krystallinisch erstarrt. Die Hauptquantität des Sirups wurde in wenig Methylalkohol gelöst und soviel Aether hinzugesetzt, dass die Flüssigkeit sich etwas trübte. Nach Impfung mit ein wenig d-Mannose war am nächsten Tage eine reichliche Krystallisation erfolgt. Die Lösung der Krystalle drehte rechts und gab mit Phenylhydrazin wiederum eine Ausscheidung von Hydrazon. Damit sind die Angaben von Hessenland¹⁾ und E. Salkowski²⁾ bezüglich des Hefegummis bestätigt.

Das oben erwähnte alkoholische Filtrat aus dem rohen Hydrazon wurde abgekühlt und vom abgeschiedenen Hydrazon, welches gegen 196° schmolz, abfiltrirt und sehr langsam verdunstet. Das so erhaltene Hydrazon war schwach gelb gefärbt und schmolz gegen 176°. Dasselbe wurde nochmals in wenig starkem Alkohol gelöst, abfiltrirt und wieder langsam verdunstet, alsdann auf Thonteller ausgestrichen. Das Hydrazon war jetzt rein weiss und schmolz gegen 171°. Die weitere Untersuchung dieses Hydrazons war leider nicht möglich, da die Menge desselben zu gering war.

Das oben erwähnte Osazon wurde einmal aus schwachem Alkohol umkrystallisirt und dabei in schönen, lebhaft gelb gefärbten Krystallen erhalten. Es schmolz scharf gegen 206° bei schnellem Erhitzen, ist demnach als Glucosazon zu betrachten.

Die Bildung von Glucosazon im Filtrat von Mannosehydrazon ist nicht für die Gegenwart von Glucose beweisend, da ja dasselbe Produkt aus dem in Lösung befindlichen Mannosederivat entstehen kann. Allerdings bezieht Hessenland den gleichen von ihm erhobenen Befund auf Glucose. Die Möglichkeit, dass aus dem Hefegummi auch Glucose durch Inversion entsteht, ist allerdings nicht in Abrede zu stellen, ein Beweis liegt aber nicht vor.

1) Zeitschr. des Vereins für Zuckerindustrie, Bd. 42, S. 671.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 312.

Die Gegenwart von Fructose in dem Sirup konnte ich ausschliessen, da derselbe mit Resorcin + Salzsäure keine Farbenreaction gab.

Ich komme somit zu dem Schluss, dass das Hefegummi aus einer Substanz besteht, welche bei der Hydrolyse hauptsächlich d-Mannose, vielleicht nebenher wenig d-Glucose liefert, ausserdem aber auch noch ein Methylpentosan enthält, wenn auch nur wenig, und zwar wahrscheinlich ein bei der Hydrolyse Fucose lieferndes, wenigstens deutet die Bildung von Methylfurfurol und der Schmelzpunkt des in starkem Alkohol leicht löslichen Hydrazons darauf hin.

II. Versuch zur Darstellung kohlehydratfreien Invertins.

Die Darstellung des Rohinvertins geschah im Wesentlichen nach dem von Osborne¹⁾ angegebenen Verfahren. Dasselbe wurde dem von E. Salkowski angegebenen — vorsichtiges Trocknen der Hefe, dann stundenlanges Erhitzen bei über 100° — vorgezogen, einerseits, weil das letztere schwieriger ist und leicht einmal ein wenig wirksames Präparat liefert, andererseits, weil es wünschenswerth erschien, auch für die auf diesem Wege hergestellten Invertinpräparate nebenher nachzuweisen, dass sie gummihaltig sind, wenn auch die Bildung von Mannose aus solchen Präparaten nach Kölle hierüber kaum noch einen Zweifel liess.

500 g Presshefe wurden mit 500 ccm. 93° igem Alkohol (Gewichtsprocente) angerieben, der Brei 24 Stunden bei Zimmertemperatur — ca. 17° C. — stehen gelassen, dann abgesaugt. Die rückständige Masse wurde mit 600 ccm. Chloroformwasser in einem verschlossenen Gefäss unter häufigem Umschütteln bei 35° gehalten. Nach bestimmten Tagen wurde der Hefebrei mit der Nutsche abgesaugt und das immer noch stark trübe Filtrat aufs Neue durch schwedisches Filtrirpapier von Munktell, beste Sorte, filtrirt. Dieses Papier wurde gewählt, weil alle anderen Filtrirpapiere trübe Filtrate lieferten. Das klare, etwas gelb gefärbte Filtrat wurde in das dreifache

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII. S. 408.

Volumen von 93% igem Alkohol eingegossen, dann, sobald sich der weisse Niederschlag zusammengeballt hatte, abfiltrirt und mit absolutem Alkohol und Aether entwässert, über Schwefelsäure getrocknet.

a) Um den Einfluss der Zeit der Digestion auf die Ausbeute an Invertin und den beigemischten Substanzen zu prüfen, wurde ein Drittel der Mischung nach einem Tag, der Rest nach 6 Tagen abfiltrirt, mit Alkohol gefällt u. s. w. Das erste Präparat soll A, das zweite B heissen. Die Ausbeute von A betrug 0,499 g = 0,3% der angewendeten Hefe, die Ausbeute von B 1,26 g = 0,38% der Hefe.

Von beiden Präparaten wurden 1% ige Lösungen hergestellt und ihre Wirksamkeit festgestellt. 2 ccm. der Lösung wurden zu 20 ccm. einer 1% igen Rohrzuckerlösung hinzugesetzt, die Mischung 1½ Stunden bei 40° gehalten, dann beide Proben zum Sieden erhitzt und nach Abkühlung gegen genau 5 ccm. Fehling'sche Lösung titirt. Zur Endreaction waren erforderlich 5,7 ccm. der Lösung von A und 7,2 ccm. der Lösung von B. Beide Präparate waren gummihaltig. Die schwächere Wirkung von B erklärt sich vermuthlich durch grösseren Gummigehalt. Durch die Verlängerung der Zeitdauer der Extraction mit Chloroformwasser wird also zwar die Ausbeute gesteigert, das Präparat aber weniger wirksam, vielleicht in Folge stärkeren Gummigehalts.

b) Die fractionirte Fällung mit Alkohol. Durch Vorversuche war festgestellt, dass eine 1% ige Hefegummilösung durch Zusatz des 1½- bis 2-fachen Volumens Alkohol von 93% nicht gefällt wird. Es schien daher denkbar, auf diesem Wege zu einem reinen Invertinpräparat zu gelangen.

Das klare Filtrat aus ½ Kilo Presshefe — im Ganzen 400 ccm. — wurde mit 200 ccm. 93% igem Alkohol versetzt, worauf etwas Trübung, aber kein Niederschlag entstand. Nach Hinzufügung von weiteren 200 ccm. Alkohol entstand eine Fällung, welche, sobald sie sich zusammengeballt hatte, abfiltrirt und mit absolutem Alkohol, dann mit Aether behandelt wurde. Das so erhaltene Präparat heisse A.

Das Filtrat von A (der Waschalkohol war nicht hinzu-

genommen) wurde wiederum mit 200 ccm. Alkohol versetzt u. s. w. Das so erhaltene Präparat sei mit B bezeichnet.

Das Filtrat von B wurde nochmals mit 200 ccm. Alkohol versetzt und so das Präparat C erhalten. Die Ausfällung war nun eine vollständige: ein weiterer Zusatz von Alkohol zum Filtrat von C bewirkte keinen Niederschlag mehr. Von allen Präparaten wurde das Gewicht nach dem Trocknen über Schwefelsäure festgestellt, ferner die Wirksamkeit der 1^o igen Lösung wie oben durch Titrirung der gebildeten Zuckerlösung gegen 5 ccm. Fehling'sche Lösung.

Die Resultate sind in folgender kleinen Tabelle zusammengestellt:

	Ausbeute	Wirksamkeit. Erforderte ccm.	Gummi-gehalt
A	0.726	5.4	viel
B	0.226	3.2	weniger
C	0.603	9.5	der

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass bei Gegenwart von Invertin, bzw. den sonst in den wässerigen Auszug übergehenden Bestandtheilen der Hefe das Gummi schon durch Zusatz des gleichen Volumens Alkohol gefällt wird, und zwar aus einer Lösung, welche weniger als 1^o Gummi enthält, da ja in der angewandten 1^o igen Lösung des Niederschlages noch andere Bestandtheile vorhanden waren. Am reichsten an Invertin war offenbar die Fraction B, indessen war die Quantität derselben sehr gering. Es schien darnach nicht gerade aussichtslos, auf dem Wege der wiederholten fractionirten Fällung weiter zu gelangen, indessen war dieser Weg jedenfalls sehr mühevoll und noch mit dem Uebelstande behaftet, dass bei der erforderlichen wiederholten Behandlung mit Alkohol vorauszusehen war, dass das Präparat fortdauernd an Wirksamkeit verlieren werde. Ich versuchte daher vorher

verschiedene Fällungsmittel und gelangte mit einem derselben, dem Kupferacetat, einigermaassen zum Ziel.

c) Ausfällung mit Kupferacetat, 5 nach dem Osborne'schen Verfahren dargestellte Präparate von Rohinvertin wurden in 1%ige Lösung gebracht, filtrirt, die Lösung wurde bei genauer neutraler Reaction (event. Zusatz von etwas Essigsäure oder Na_2CO_3) mit etwa 20 ccm. 5%iger Kupferacetatlösung versetzt, der Niederschlag zuerst durch Decantiren, dann auf dem Filter gut gewaschen, in einer Reibschale gut verrieben, bis keine gröberen Partikel mehr sichtbar waren, dann der Kupferniederschlag durch Schwefelwasserstoff zersetzt, das Kupfersulfid durch Stehenlassen bei $35-40^\circ$ für eine halbe Stunde zum Absetzen gebracht, filtrirt, der Schwefelwasserstoff aus dem Filtrat durch einen Luftstrom ausgetrieben, die vom Schwefelwasserstoff befreite Lösung in das dreifache Volumen Alkohol eingegossen. Es entstand zunächst keine Fällung, wohl aber nach Zusatz einer Spur Kochsalzlösung. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, mit absolutem Alkohol und Aether behandelt, über Schwefelsäure getrocknet.

Man erhielt so ein grauweisses, leicht in Wasser lösliches Pulver, welches keine Eiweissreactionen gab und in allen Fällen, bis auf einen, frei war von Gummi. In dem einen war auch die Trennung vom Schwefelkupfer schlecht gelungen. Alle Präparate waren wirksam, aber ihre Menge war sehr gering und die Wirksamkeit hatte offenbar auch Schaden gelitten, so dass man auch dieses Verfahren keinen glatten Weg, um zu einem gummifreien, gut wirksamen Präparat zu gelangen, nennen kann. Vielleicht würde die Combination der Fällung mit Alkohol mit derjenigen mit Kupferacetat weiter führen.

Aus äusseren Gründen war ich leider verhindert, diesen Gegenstand weiter zu verfolgen.

Am Schluss möchte ich nicht verfehlen, Herrn Professor E. Salkowski meinen herzlichsten Dank für seine stete liebenswürdige Unterstützung auszudrücken.