

# Einige Beiträge zur Kenntnis des Invertins der Hefe.

Von  
Dr. B. Hafner.

Mit einer Tafel.

(Auszug aus der gleichbetitelten Tübinger Inauguraldissertation vom Jahre 1903. — Aus dem physiologisch-chemischen Institute zu Tübingen.)

(Der Redaktion zugegangen am 26. April 1907.)

Über die chemische Natur des Invertins sind nun schon eine ganze Reihe von Untersuchungen und zwar von den verschiedensten Forschern ausgeführt worden, und trotzdem kann man leider bis heute nicht sagen, daß dadurch das Dunkel, das über dem Wesen dieses wie der andern Fermentkörper liegt, auch nur in einigermaßen befriedigender Weise aufgehellt worden wäre: ja es will sogar scheinen, als ob überhaupt jeglicher Versuch, hierüber Aufschluß zu gewinnen, noch auf lange hinaus aussichtslos, jedenfalls in jetziger Zeit noch sehr verfrüht wäre.

Aber wie dem auch sein mag, so dürfen wir uns doch nicht abhalten lassen, auch jetzt schon immer vor neuem einzelne Fragen, die sich uns bei Betrachtung des Gegenstandes aufdrängen, laut aufzuwerfen und deren Beantwortung, so gut und so exakt es gehen mag, auf dem Wege des Experiments zu versuchen. Solche Untersuchungen können immerhin neue Tatsachen zutage fördern und können Beiträge zu dem wissenschaftlichen Materiale liefern, das nötig ist, um die einstige Lösung des Problems wenigstens vorzubereiten. Dabei ist dann keine Frage, auch keine Vermutung, selbst wenn sie manchem als irrig erscheinen mag, nutzlos und umsonst: wenn sie nur nach irgend einer Seite hin zu einer wissenschaftlichen Untersuchung anregt, die eine bestimmte Antwort, Ja oder Nein, erwarten läßt.

Aus diesem Grunde habe auch ich mich nicht geschent, die Beantwortung einiger Fragen zu unternehmen, die sich mir beim Studium der neuesten Arbeiten über das Invertin aufgedrängt hatten. Vornehmlich folgende Punkte sind es, die mir aufgefallen waren und einer experimentellen Untersuchung nicht unzugänglich erschienen.

1. Die Asche der verschiedenen Invertinpräparate ist, wie schon lange bekannt, stets phosphorsäurehaltig und besteht überhaupt vornehmlich aus Kalium- und Magnesiumphosphat. Läßt sich die Phosphorsäure wohl ganz aus den Präparaten entfernen, ohne die Wirksamkeit derselben zu zerstören? oder gehört der Phosphor vielmehr selber zur Konstitution einer organischen Gruppe? Da wir über die Menge der in den wirksamen Präparaten enthaltenen Phosphorsäure bisher noch keine hinreichenden Angaben besitzen,<sup>1)</sup> so ist eine Reihe von Rohinvertinen, ebenso wie von gereinigten Präparaten, zu veraschen und der Phosphorsäuregehalt der einzelnen Aschen quantitativ zu bestimmen.

2. Gehört das in den bisher dargestellten Invertinpräparaten stets auftretende Kohlenhydrat zur Konstitution der eigentlich wirksamen Substanz oder ist es in der Tat nur eine Verunreinigung und läßt sich diese vielleicht beseitigen? Ist das letztere der Fall, so wird ein davon befreites Präparat seine Wirksamkeit behalten; andernfalls muß es sie verlieren.

3. Stammt der in den einzelnen Invertinpräparaten regelmäßig, wenn auch in wechselnder Menge gefundene Stickstoff von näheren und komplexeren Proteinderivaten oder von einer oder mehreren kleineren stickstoffhaltigen Gruppen, als da sind: Aminosäuren, Abkömmlinge des Purins, Pyrimidins und dergleichen?

#### Ausgangsmaterial und Darstellungsweise der wirksamen Präparate.

Für die Darstellung meiner Präparate habe ich mich nacheinander zweier verschiedener Arten von Ausgangsmaterial bedient. Zu Anfang meiner Versuche benutzte ich dazu eine

<sup>1)</sup> Bisher liegen nur einige Beobachtungen Salkowskis vor, die allerdings auf organisch gebundenen Phosphor hinweisen. Vergl. Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 321—323.

reine Preßhefe, von der mir durch die Hefezuchtanstalt des Vereins deutscher Spiritusfabrikanten in Berlin mehrmals größere Mengen in liberalster Weise zur Verfügung gestellt wurden. Diese Hefe besaß einen durchschnittlichen Wassergehalt von 76% und einen Aschengehalt der Trockensubstanz von ungefähr 9%.

Aus etwa 10 kg derselben hatte vor mir schon ein anderer Arbeiter des Instituts, Herr Dr. Höpfner, zu wiederholten Malen wirksames Invertin extrahiert; trotzdem lieferte mir die gleiche Hefe, als ich sie ein ganzes Vierteljahr nach jenem — sie war unterdessen in einem verschlossenen Gefäße und in der Kühle aufbewahrt worden — von neuem mit Wasser auszog, abermals reichliche Mengen des gewünschten Fermentes, eine Tatsache, die deutlich darauf hinweist, daß die Hefezellen ihr Invertin nicht mit einem Male an das Wasser, mit dem sie verrührt werden, abgeben, sondern daß erst allmählich, infolge länger fortgesetzter Maceration, immer neue wirksame Komplexe im Innern der Zelle sich lösen, um sodann auf dem Wege der Diffusion in die Außenflüssigkeit zu gelangen.

Später zog ich es vor, das Rohmaterial aus einer untergärigen Bierhefe zu gewinnen, die mir von einer benachbarten Brauerei<sup>1)</sup> ebenfalls in zuvorkommendster Weise geliefert wurde.

Die Darstellungsweise des ersten Rohpräparats war in beiden Fällen, mochte das Ausgangsmaterial reine Preßhefe oder gewöhnliche Bierhefe sein, im wesentlichen dieselbe, die schon W. A. Osborne<sup>2)</sup> bei seinen Versuchen über das Invertin erprobt und empfohlen hatte. Sie bestand darin, daß jedesmal etwa 5 kg Hefe mit 5 l 95–96°-igen Alkohols in einer großen Reibschale gut angerieben, sodann, nachdem man den Brei einen Tag lang ruhig stehen gelassen, der Alkohol durch Filtration entfernt, die zurückbleibende Hefe wieder einige Tage lang in einem großen Becherglase bei ziemlich kühler Temperatur mit etwa 6 l Wasser, am besten unter beständigem Umrühren mittels eines Rührwerks, digeriert und am Ende auf mehrere große Faltenfilter gebracht wird, um vom wässrigen

<sup>1)</sup> Brauerei Heinrich in Lustnau bei Tübingen

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 399 ff.

Auszuge getrennt zu werden; worauf der Brei wieder von neuem mit Wasser übergossen und in der gleichen Weise so oft und so lange extrahiert wird, bis eine Probe der abfiltrierten Lösung nicht mehr oder kaum noch invertierend wirkt.

Das erste Filtrat wirkt jederzeit energisch invertierend, ist immer stark gelb gefärbt, reagiert mit Lackmus amphoter und gibt mit molybdänsaurem Ammoniak bei Gegenwart von konzentrierter Salpetersäure eine starke Phosphorsäurereaktion.

Nun fügt man zur Lösung soviel Ammoniak hinzu, daß sie deutlich danach riecht, und erzeugt damit rasch einen dicken Niederschlag von Ammonium-Magnesiumphosphat, der, da er sich in kurzer Zeit gut absetzt, auch bald durch Filtrieren entfernt werden kann. Ist dies geschehen, so wird die Lösung, wenn nötig, auch noch durch ein Pukallsches Tonfilter gesaugt und endlich das völlig klare Filtrat rasch bei einer  $40^{\circ}$  nicht übersteigenden Temperatur im Vacuum eingedampft. Aus dem zurückbleibenden Sirup läßt sich das wirksame Invertin ohne weiteres mit absolutem Alkohol ausfällen. Man tut aber gut, alle einzelnen Auszüge vorher in gleicher Weise zu behandeln, ihre sirupösen Rückstände zu einem einzigen zu vereinigen und erst aus diesem das Invertin durch Zusatz des mehrfachen Volumens von absolutem Alkohol auszufällen.

Der so erhaltene Niederschlag (Rohpräparat), der neben der wirksamen Substanz noch Eiweißstoffe und Mineralbestandteile enthält, wird nun zunächst aufs Filter gebracht, da nochmals mit absolutem Alkohol gewaschen, hierauf mit lauwarmem Wasser in eine Reibschale gespült und darin zu einem dünnen Brei angerieben, den man in einem Becherglase noch weiter verdünnt und einige Stunden stehen läßt.

Nach dieser Zeit hat sich auf dem Boden des Glases eine dicke schleimige Masse abgesetzt, von der die wirksame Lösung abermals durch Filtrieren getrennt wird. Es ist zweckmäßig, diese Lösung, um sie weiter zu reinigen, nunmehr nochmals mit Ammoniak zu versetzen, zu dem Zwecke, damit einen neuen Niederschlag von Ammonium-Magnesiumphosphat zu erzeugen, und endlich das Filtrat von diesem einer längeren Dialyse durch Pergamentpapier zu unterwerfen.

Bemerkenswert war mir, wenn ich mit reiner Preßhefe arbeitete, das jedesmalige Unwirksamwerden der Lösung nach dem Zusatze des Ammoniaks und ebenso die langsame Wiederkehr der Wirksamkeit — freilich nicht immer der vollen — nach mehrtägiger Dialyse.

Nach Beendigung der Dialyse muß der Inhalt des Dialysators von neuem im Vacuum eingedampft und das Invertin aus dem übrigbleibenden Sirup mit viel absolutem Alkohol gefällt werden.

Für die Dialyse benutzte ich nicht mehr den seit Kühne üblichen Pergamentschlauch, sondern einen Apparat, der es nicht nur ermöglichte, eine größere Menge der Lösung (1,5 l und mehr) auf einmal zu verwenden, sondern zugleich auch Lösung wie Außenwasser in fortwährender strömender Bewegung zu erhalten.

Der Apparat (siehe beifolgende Zeichnung) besteht aus folgenden Teilen: 1. dem zylindrischen Porzellangestell A, das sich mit einer großen Pergamentmembran überziehen läßt; 2. der hölzernen Rolle B, die ebenso wie das Porzellangestell, letzteres vermittelt des hölzernen Conus s, auf der metallenen hohlen Axe C befestigt ist, welche ihrerseits von dem Arme D eines eisernen Halters, in dessen Ringen rr sie läuft, getragen wird; 3. dem gläsernen Rührer E, der durch die hohle Axe hindurch in das Innere des Dialysators hineinragt, wo an seinem unteren Abschnitt 2 Reihen gläserner Schaufeln angeschmolzen sind, während sein oberes Ende von der metallenen gleichfalls am Halter befestigten Klemme F unbeweglich erhalten wird; 4. einem großen, etwa 10 l fassenden, mehr als zur Hälfte mit destilliertem Wasser gefüllten dickwandigen Glaszylinder G, in welchen der mit der Lösung beschickte Pergamentzylinder eingesenkt wird, soweit, daß das Niveau der Flüssigkeiten innen und außen gleich hoch steht.

Vermittelt der Triebsschnur t kann die Rolle entweder von einer kleinen Wasserturbine oder auch von einem kleinen Heißluftmotor, der durch eine Bunsenflamme betrieben wird, in Bewegung gesetzt werden. Die Zeichnung gibt bei T das Bild einer Turbine mit den Röhren für Wasserzu- und -abfluß. Beginnt sich nun der Pergamentzylinder zu drehen, so wird alsbald auch das umgebende Wasser in rotierende Bewegung

versetzt: Da aber der Rührer unbeweglich befestigt ist, so bildet er mit seinen Schaufeln ein Hindernis für die gleichmäßige Vorwärtsbewegung der im Innern befindlichen Lösung und bewirkt vielmehr ein solch fortgesetztes Wirbeln und Durcheinandermischen der letzteren, daß während der ganzen Dauer der Dialyse immer neue Teilchen an die innere Oberfläche der Membran gelangen und so den gewünschten Prozeß erheblich beschleunigen.

Das Porzellan­gestell ist, wie aus der Zeichnung ersichtlich, von zwei mit je einer horizontalen Rille versehenen Ringen gebildet, die durch schmale Längsstäbe miteinander verbunden sind, und besitzt eine Höhe von 25 und einen Kreis­durchmesser von 10 cm. Das Überziehen derselben mit der Membran geschieht in der Weise, daß der untere Porzellanring fest auf einen großen, vorher gut durchfeuchteten, auf einer sauberen dicken Glasplatte ausgebreiteten Pergamentbogen (sogen. echtes Pergament Nr. 2) aufgepreßt und hierauf der über den Ring hinausragende Teil der Membran von unten um das Gestell heraufgeschlagen und durch Umschnüren mit Bindfäden an den beiden Ringen des Gestells, da wo sich die Rillen befinden, festgebunden wird. (Siehe auf beistehender Zeichnung Fig. 2.)

Dadurch entsteht ein Hohlraum, dessen Bodenfläche nahezu flach, dessen Seitenwände aber stark gefaltet sind. Anstatt ein Fehler zu sein, sind die dadurch bedingten Ausbuchtungen vielmehr von Nutzen: denn sie vergrößern nur die Oberfläche. Auf die Auswahl der Membran muß die größte Sorgfalt verwendet werden. Jedenfalls ist vor der Benutzung des Apparates nochmals genau zu prüfen, ob nicht irgendwo ein feines, kaum sichtbares Löchelchen in ihr vorhanden ist, was sich nach dem Eingießen von Wasser in das Innere alsbald durch rascheres Abtropfen an solchen Stellen zu erkennen gibt.

Dauert die Dialyse, wie gerade in unserem Falle, nicht bloß Tage, sondern bisweilen mehrere Wochen an, so muß die Außenflüssigkeit, um das Diffusionsgefälle möglichst hoch zu erhalten, öfter, jedenfalls täglich, erneuert werden. Ferner ist, wenn die Versuche im Sommer angestellt werden, dafür Sorge zu tragen, daß weder die Lösung im Innern noch die

Außenflüssigkeit in Fäulnis geraten. Es empfiehlt sich deshalb der Zusatz von etwas Toluol zu beiden.

Zu dem ersten derartigen Versuche, ein wirksames Invertinpräparat darzustellen, wurden 5 Kilo der obengenannten reinen Preßhefe angewandt. Nachdem ich diese Menge 4mal nacheinander mit Wasser ausgezogen, die vereinigten Extrakte in oben beschriebener Weise behandelt und namentlich die Dialyse 8 Tage lang fortgesetzt hatte, erhielt ich aus der Innenflüssigkeit des Dialysators durch Füllen mit absolutem Alkohol, Waschen des Niederschlags mit Alkohol und Äther und Trocknen desselben im Vacuum über Schwefelsäure zuletzt nur noch 3,1 g eines leichten grauweißen Pulvers, das sich allerdings sehr wirksam erwies.

Die Analyse desselben ergab folgendes:

Aschenbestimmung.

1. 1,8686 g trockener Substanz hinterließen 0,0379 g, entsprechend 2,03% Asche;
2. 0,0379 g Asche enthielten 0,0309 g  $P_2O_5$ , entsprechend 81,54%  $P_2O_5$  oder 35,60% P.

Daraus berechnet sich für das Invertinpräparat selbst ein Gehalt von 1,65%  $P_2O_5$  oder 0,72% P.

Elementaranalyse.

1. 0,1985 g trockener Subst. lieferten 0,317 g Kohlensäure u. 0,1195 g Wasser;
2. 0,2687 » » » gaben nach Kjeldahl 0,0109 g Stickstoff.

Also enthielt die aschenfreie Substanz:

C	44,54%	—
H	6,86%	—
N	—	4,16%

Zu den Analysen sei bemerkt, 1. daß ich die Substanz zum Zwecke der Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung erst mit etwas Kaliumdichromat vermischt und dann im Schiffehen verbrannt, 2. daß ich die Aschenbestimmungen, ebenso wie Kölle,<sup>1)</sup> nach der Methode von Strecker ausgeführt habe. Danach wird bekanntlich eine Menge von etwa 1—2 g der trockenen Substanz vorsichtig im Porzellantiegel verkohlt, sodann der aschenhaltigen Kohle soviel konzentriertes Barytwasser von bekanntem Gehalte zugefügt, daß etwa die Hälfte mehr BaO vorhanden ist, als die in der Asche anwesende Phosphorsäure zu binden vermag, und endlich, nachdem die Lösung auf dem Wasserbade eingedampft worden, mehrere Stunden lang bei schwacher Rotglut im Muffelofen er-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 430.

hitzt. Zuletzt wird der Rückstand mit etwas Ammoniumkarbonatlösung befeuchtet, um etwa ungebundenes BaO in Baryumkarbonat überzuführen, und dann nochmals etwa eine Stunde lang schwach in der Muffel geglüht. Nach dem Wägen des Glührückstandes wird die Kohlensäure desselben zweckmäßig nach Kolbe<sup>1)</sup> bestimmt und, wenn dies geschehen, deren Gewicht samt dem des zugesetzten Baryumoxyds vom Gewichte des Tiegelinhaltes abgezogen, so daß sich der Rest als Gewicht der vom verbrannten Präparate allein herrührenden Asche ergibt.

Da erst später, als mir Invertinpräparate von größerem Aschengehalte zu Gebote standen, genauere Analysen von solchen Aschen ausgeführt werden konnten, so habe ich mich beim ersten, wie beim folgenden Präparate, mit der Bestimmung des Phosphorsäuregehaltes derselben begnügen müssen. Ich will aber doch schon hier an einem einzelnen Beispiele — es betrifft das später (S. 19) zu erwähnende Invertin IIb — den Gang einer Aschenanalyse, wie sie bei mehreren Präparaten durchgeführt wurden, ausführlich beschreiben:

2,8698 g trockenes Invertin wurden mit 1,1801 g BaO in angegebener Weise verascht. Die zurückgebliebene baryumkarbonathaltige Asche wog 1,9262 g. In 1,3628 g dieser Asche wurde die Kohlensäure nach Kolbe bestimmt. Ihre Menge betrug 0,0803 g, also 0,1131 g Kohlensäure auf 1,9262 g Gesamtasche. Wir finden also  $1,9262 - (1,1801 + 0,1131) = 0,6327$  g Asche in 2,8698 g Invertin, d. h. 22,04%.

Zur quantitativen Bestimmung einzelner Aschenbestandteile wurde die salzsaure Lösung der Asche zunächst vom unlöslichen Baryumsulfat abfiltriert und das Filter samt darauf befindlichem Niederschlage mit warmem Wasser gewaschen, getrocknet, im Platintiegel verascht und geglüht. Es hinterblieben 0,1535 g BaSO<sub>4</sub>, entsprechend 0,0526 g SO<sub>3</sub>. Das salzsaure Filtrat samt Waschwasser wurde mit Ammoniumkarbonat versetzt, bis eine schwache bleibende Trübung entstand, die ich durch einige Tropfen Salzsäure wieder beseitigte. Dann setzte ich tropfenweise Ferrichlorid hinzu, bis die über dem entstehenden gelblichweißen Niederschlage des Ferriphosphats befindliche Flüssigkeit braun gefärbt erschien, verdünnte auf ungefähr 400 ccm mit heißem Wasser, erhitzte zum Sieden, kochte etwa noch eine Minute, filtrierte und wusch dann mit heißem, ammoniumacetathaltigem Wasser gut aus. Nachdem ich sodann den Niederschlag mit warmer, verdünnter Salpetersäure gelöst, die Phosphorsäure aus dieser Lösung mit molybdänsaurem Ammoniak ausgefällt und den neuen Niederschlag wieder mit warmem Ammoniak gelöst hatte, wurde endlich die Phosphorsäure in bekannter Weise mit Magnesiummischung gefällt und nach dem Auswaschen und Glühen als Magnesiumpyrophosphat gewogen. Es hinterblieben 0,4868 g M<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, entsprechend 0,3104 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

<sup>1)</sup> Fresenius, Quantitative Analyse, I. 6. Aufl., S. 449.



Im Filtrate vom Eisenniederschlage befanden sich nun die alkalischen Erden und Alkalien. Das Baryum wurde daraus, da seine Gesamtmenge ja bekannt war, ohne weiteres mit verdünnter Schwefelsäure abgeschieden, das baryumfreie Filtrat aber in einer Platinschale zur Trockene verdampft, die Ammonsalze verjagt, der zurückgebliebene Rest in wenig Salzsäure gelöst und diese Lösung genau bis auf 100 ccm verdünnt.

50 ccm dieser Lösung wurden zur Bestimmung der Magnesia verwendet. Es wurden gefunden 0.014 g  $Mg_2P_2O_7$ , in 100 ccm also 0.028 g, entsprechend 0.0102 MgO.

In einigen Fällen wurde noch eine Trennung mit Ammoniumoxalat vorgenommen, um auch noch etwa vorhandenen Kalk zu bestimmen.

Aus den anderen 50 ccm der Lösung wurde die Magnesia mit Barytwasser als Magnesiumhydroxyd abgeschieden und im Filtrate davon, nachdem ich das Baryum mit Ammoniumkarbonat entfernt, sämtliches Alkali als Sulfat bestimmt und auf Kalium umgerechnet. So fand ich in 50 ccm 0.0756 g, in 100 ccm also 0.1512 g  $K_2SO_4$ , entsprechend 0.0817 g  $K_2O$ .

Ein zweites wirksames Präparat, das in derselben Weise wie das erste aus einer andern Portion, und zwar abermals aus 5 kg, der gleichen reinen Preßhefe dargestellt worden war, lieferte bei der Analyse folgende Zahlen.

#### Aschenbestimmung.

1. 2.3757 g trockener Substanz hinterließen 0.0429 g = 1.80% Asche.
2. 0.0429 g Asche enthielten 0.0354 g  $P_2O_5$ , entsprechend 82.70%  $P_2O_5$ , oder 36.11% P.

Das veraschte Präparat besaß demnach 1.49%  $P_2O_5$  oder 0.65% P.

#### Elementaranalyse.

1. 0.2195 g trockener Subst. lieferten 0.3571 g Kohlensäure u. 0.1372 g Wasser.
2. 0.4268 g trockener Substanz gaben nach Kjeldahl 0.009345 g Stickstoff.

Das Präparat enthielt demnach aschenfrei:

C	45.17%	—
H	7.13%	—
N	—	2.23%

In folgender kleinen Tabelle sind meine eigenen analytischen Resultate mit denen zusammengestellt, die Herr Dr. Höpfner vor einigen Jahren bei der Analyse zweier Präparate erhielt, die er in ähnlicher Weise, wie ich, aus derselben Berliner Preßhefe gewonnen hatte.

Nr. des Präparats	Aschengehalt in %	C in %	H in %	N in %	Autor
1.	4.36	44.18	6.66	4.26	} Höpfner <sup>1)</sup>
2.	2.70	44.77	6.25	4.16	
1.	2.03	44.54	6.86	4.16	} Hafner
2.	1.86	45.17	7.13	2.23	

Sieht man ab von dem stark abweichenden Stickstoffgehalte meines Präparates 2 — dessen niedriger Zahlenwert aber wahrscheinlich auf einem Fehler der Analyse beruht —, so deutet die ungefähre Übereinstimmung der sonstigen analytischen Daten in der Tat auf eine merkwürdige Gleichartigkeit der 2 zu verschiedenen Zeiten und von verschiedenen Autoren, aber aus der gleichen Hefeart, dargestellten Präparate.

Wie oben angegeben, waren die von mir analysierten Präparate, ebenso wie diejenigen Höpfners, aus der im Innern des Dialysators zurückgebliebenen Lösung gewonnen.

Wie verhielt es sich nun mit dem wirksamen Ferment, das bekanntlich während lange fortgesetzter Dialyse regelmäßig neben den Salzen durch die Membran nach außen dringt? Schon Kölle<sup>2)</sup> klagt darüber, daß bei seinen Versuchen, das Ferment zu reinigen, während der mehrtägigen Dialyse durch die ihm zu Gebote stehenden Pergamentschläuche mit den anorganischen Salzen jedesmal auch eine ziemlich reichliche Menge wirksamer organischer Substanz diffundiert sei. Ich selber machte die gleiche Beobachtung und zwar fand ich die Außenflüssigkeit bald deutlich wirksam. Ja es gelang sogar, als ich die Außenflüssigkeit von mehreren Tagen sammelte und im Vacuum bei 35° auf ein kleines Volumen eindampfte, daraus durch Zusatz von viel absolutem Alkohol einen Niederschlag zu fällen, der nach dem Waschen mit absolutem Alkohol und Äther und nach dem Trocknen im Vacuum über Schwefelsäure ein ähnliches leichtes, hellgelbes Pulver darstellte, wie das aus der Innenflüssigkeit, ein Pulver, das stark wirksam war, keine

<sup>1)</sup> Auch Höpfners Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffprocente sind auf aschentfreie Substanz berechnet.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 430.

Biuretreaktion gab, wohl aber nach dem Kochen mit Salzsäure Fehlingsche Lösung reduzierte, zum Beweise dafür, daß auch diesem ziemlich leicht diffundierenden Komplexe ein Kohlenhydrat anhing.<sup>1)</sup>

Anfangs hegte ich wohl den Verdacht, daß die Membran irgendwo ein Leck haben möge, ein Löchelchen oder einen feinen Riß, durch den die Lösung als Ganzes nach außen sickern könne. Indessen wurde dieser Verdacht bald durch die Tatsache widerlegt, daß das Flüssigkeitsvolumen im Innern nach mehreren Tagen merklich gewachsen, sein Niveau über das äußere gestiegen war.

Den Phosphor des Rohinvertins völlig durch die Dialyse zu entfernen, ist mir nicht gelungen. Ich habe die Lösung jenes aus der zweiten Reinhefeportion dargestellten Rohpräparats sogar einer 24 Tage andauernden Dialyse unterworfen. Zuletzt konnte in dem täglich erneuerten Außenwasser nur noch dann Phosphorsäure nachgewiesen werden, wenn wenigstens 500 cem desselben bis auf wenige Kubikzentimeter eingedampft worden waren; aber trotzdem erwies sich, wie oben gezeigt wurde, das aus der Innenflüssigkeit am Ende dargestellte Invertinpräparat bei der Veraschung immer noch als phosphorhaltig.

Zu wiederholten Malen hatte ich an den aus der Berliner Reinhefe dargestellten Präparaten die bedauerliche Erfahrung gemacht, daß sie sowohl gegen Ammoniak, wie gegen Alkohol äußerst empfindlich waren. Waren namentlich die späteren Auszüge auch bis nach dem Eindampfen im Vacuum immer wirksam geblieben, so verloren sie doch diese Wirksamkeit zu häufig bald nach der Fällung mit Alkohol. Und doch war sowohl der Alkohol, wie der zum Waschen benutzte Äther stets vollkommen rein. Mit Aceton als Fällungsmittel machte ich keine besseren Erfahrungen.

In der Erwägung, daß diese Empfindlichkeit vielleicht mit

---

<sup>1)</sup> Daß das der Hefe eigentümliche Kohlenhydrat durch Pergamentpapier diffundiert, hat auch schon Wroblewski beobachtet. In Bd. 31, S. 1134 der Berliner chemischen Berichte sagt er darüber: «Dieses Kohlehydrat wirkt nicht invertierend, es dialysiert schwer, aber leichter als die Proteinstoffe».

der Natur der verwandten Hefe selbst, mit ihrer Reinheit, also dem Umstande zusammenhängen dürfte, daß sich diese Hefe unter möglichst günstigen Bedingungen, geschützt vor fremden und feindlichen Mikroorganismen, hatte entwickeln dürfen und deshalb, wenn der Ausdruck erlaubt ist, etwas verzärtelt war, wendete ich mich zwecks weiterer Versuche einer gewöhnlichen, im Kampfe ums Dasein mehr abgehärteten Praxishefe zu, und zwar der untergärigen Bierhefe, in der Hoffnung, daraus Präparate zu gewinnen, die auch von Alkohol und Ammoniak weniger geschädigt würden.

Zur Darstellung des ersten Rohpräparates aus diesem Materiale befolgte ich im Prinzip gleichfalls die Methode von Osborne, nur in nachstehend beschriebener Weise modifiziert.

Zunächst wurde die frische Bierhefe durch Sieben und Waschen mit Wasser von 1—3° Temperatur von den Bestandteilen der vergorenen Bierwürze gereinigt, hierauf aber durch Absaugen auf der Nutsche wiederum möglichst von dem äußerlich anhaftenden Wasser befreit. Die so vorbereitete Hefe, die eine gelblichweiße Farbe, schwachen Geruch und einen Wassergehalt von 75—80% besaß, wurde nun mit dem gleichen Gewichte 96% igen Alkohols übergossen, damit zu einem gleichmäßigen Brei angerieben und dieser 24 Stunden lang ruhig stehen gelassen. Alsdann wurde der Alkohol durch Papierfilter oder, was noch besser, durch ein Flanelltuch abgeseiht, die rückständige Masse mit dem doppelten Gewichte Wasser, unter Zusatz von etwas Toluol (15 g auf 1 l), angerührt und der Brei 2—3 Tage lang unter stetem Umrühren bei einer ziemlich niedrigen Temperatur, höchstens 2—5° über Null, erhalten. Am Ende wurde er auf mehrere Faltenfilter gebracht und, falls die Flüssigkeit nicht völlig klar abließ, die Filtration derselben unter Zusatz von etwas spanischer Erde wiederholt. Das endlich gewonnene klare, gelbgefärbte, übrigens angenehm riechende Filtrat wurde hierauf im Vacuum bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur bis zum dünnen Sirup eingedampft, dieser in ein Becherglas gegossen, mehrere Stunden im Kühlen stehen gelassen und, nachdem sich die ausgeschiedenen Stoffe (anorganische Salze etc.) hinlänglich

abgesetzt, wiederum filtriert. Das unterdessen etwas braun gewordene Filtrat ward jetzt in kleinen Portionen folgendermaßen weiter behandelt:

Zunächst setzte ich zu je 50 cem desselben, die sich in einem 500 cem fassenden Becherglase befanden, unter fortwährendem Umschwenken langsam 50 cem oder wenig mehr absoluten Alkohols hinzu, sodaß die Flüssigkeit oben trübe oder milchig ward, aber doch noch keine weißen Flocken ausschieden: dann fügte ich dieser Mischung wenigstens noch 300 cem absoluten Alkohols auf einmal zu und ließ nun das Ganze nach einmaligem Umschwenken einige Minuten ruhig stehen, bis sich die Hauptmenge eben in Gestalt weißer oder gelber Flocken abgesetzt hatte. Hierauf goß ich den darüberstehenden noch milchigen Alkohol ab und überschüttete den Niederschlag nochmals mit 200—300 cem absoluten Alkohols. Jegliches Rühren mit einem Glasstabe wurde dabei absichtlich vermieden, da der Niederschlag sonst als harzige Masse an diesem festklebt, die — eine bemerkenswerte, auch von Anderen bereits mehrfach gemachte Erfahrung — nach dem Trocknen bald unwirksam wird.

Dagegen habe ich es ratsam gefunden, das ausgeschiedene Rohinvertin noch 1—2 mal mit kleinen Mengen absoluten Alkohols zu übergießen und es erst dann, wenn es infolge mehrstündigen Stehens unter diesem seine weiche Konsistenz verloren hatte, aufs Filter zu bringen, daselbst nacheinander mit absolutem Alkohol und wasserfreiem Äther auszuwaschen und es zuletzt durch Absaugen auch von diesem zu befreien. Es ist ferner zweckmäßig, den Niederschlag nicht auf ein einziges größeres Filter aufzugießen, sondern ihn auf mehrere kleine Filter zu verteilen, da er dann leichter auszuwaschen und rascher zu trocknen ist.

Aus den abgegossenen Portionen des milchig getrübbten Alkohols, die in einem Glase vereinigt und kühl gestellt wurden, schied sich nach einigen Stunden nochmals eine ansehnliche Menge eines weißlichen Niederschlages aus, der in gleicher Weise wie die Hauptmenge gesammelt und gewaschen werden konnte. Nach dem Trocknen im Vacuum über konzentrierter Schwefel-

säure stellte dieses Rohpräparat ein außerordentlich wirksames, weißes oder höchstens gelblich gefärbtes, lockeres Pulver dar, das frei war von jeglicher harzigen oder gar hornartigen Beimengung.

Der soeben gegebenen Beschreibung des allgemeinen Verfahrens, nach welchem nacheinander 4 verschiedene Portionen Bierhefe mehrmals extrahiert und die erhaltenen Extrakte verarbeitet wurden, habe ich noch einige speziellere Bemerkungen hinzuzufügen.

Schon Hoppe-Seyler hatte bekanntlich die Beobachtung gemacht, daß lebende Hefe das gewünschte Ferment nur schwierig fahren läßt, tote dagegen sehr leicht.

Man begreift deshalb die Notwendigkeit, die Hefe vorher zu töten, ehe man sie mit Wasser auszieht. Dazu dient das vorherige Übergießen und Verreiben der frischen Hefe mit starkem, etwa 95%igem Alkohol. Diese Operation bietet zugleich den weiteren Vorteil, daß durch sie ein großer Teil der in der Zellflüssigkeit gelösten Eiweißkörper koaguliert und unlöslich oder wenigstens schwerlöslich in Wasser gemacht wird.

Da aber ferner die Hefezelle auch proteolytisches Ferment enthält, das um so energischer wirkt, je höher — bis zu einer gewissen Grenze — die Temperatur, so ist es im Interesse der Fernhaltung von Zersetzungsprodukten des Eiweißes geraten, die Hefe bei möglichst niedriger Temperatur, bei höchstens 3—4° über Null, mit Wasser auszuziehen. Auch löst sich ja unser wirksames Ferment schon bei niedriger Temperatur sehr rasch, ungleich langsamer dagegen gewisse, durch das proteolytische Ferment erzeugte Zersetzungsprodukte, wie Leucin, Tyrosin und verwandte.

Einen Begriff von der Ausbeute an wirksamem Rohpräparat mögen folgende Daten geben.

Im ersten Versuche wurden 10 kg Lustnauer Bierhefe 4 mal nacheinander mit Wasser ausgezogen. Sie lieferten beim ersten Auszuge 268, beim zweiten 83, beim dritten 90 und beim vierten 65 g Rohinvertin. Ein anderes Mal gaben 15 kg derselben Hefesorte bei einem einmaligen Auszuge 225 g; wieder ein anderes Mal lieferten 5 kg der gleichen Art im ersten Auszuge 96 g.

Um den Einfluß der späteren Reinigung auf den Aschen- und Stickstoffgehalt des Präparates und namentlich auch auf den jedesmaligen Phosphorsäuregehalt der Asche zu erfahren, führte ich von den Rohpräparaten aus Hefe I, II, III, IV eine Reihe von Analysen aus, deren Resultate ich in folgender Tabelle kurz zusammenstelle:

Präparat aus	Prozent- gehalt an Asche	Prozent- gehalt der Asche an		Prozent- gehalt des Präpa- rates an		Prozentgehalt der aschenfreien Substanz an Stickstoff
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	P	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	P	
Hefe I. Auszug 1 . . . .	35.40	64.36	28.10	22.78	9.94	12.86
"    2 . . . .	22.87	77.91	34.01	17.83	7.78	11.81
"    3 . . . .	14.31	<sup>1)</sup> —	—	—	—	12.73
"    4 . . . .	11.98	73.42	32.05	8.79	3.83	12.53
Hefe II. Auszug 1 . . . .	29.35	—	—	—	—	—
"    2 . . . .	19.65	64.01	27.94	12.59	5.49	—
Hefe III. einmaliger Auszug	32.43	58.77	25.17	19.04	8.29	10.79
Hefe IV. Auszug 1 . . . .	36.65	68.72	30.00	25.18	10.99	12.51
"    2 . . . .	32.73	77.83	33.98	25.47	11.12	12.23

Man sieht, daß der Aschengehalt aller dieser Röhpräparate, namentlich derjenige der ersten Auszüge, ein sehr bedeutender ist, und daß derselbe abnimmt, je öfter man die ursprüngliche Hefe extrahiert; daß aber letzteres für den Phosphorgehalt der Asche selber nicht zutrifft, und endlich, daß der Stickstoffgehalt, der an sich ein hoher ist (3mal größer als derjenige der gereinigten Invertinpräparate aus Berliner Preßhefe), bei den verschiedenen Auszügen einer Hefe im wesentlichen auf gleicher Höhe bleibt.

Um zu prüfen, ob sich der Phosphorsäuregehalt eines Präparates nicht auch schon während der ersten Extraktion der Hefe herabdrücken lasse, rührte ich in einem Versuche 2 kg der in der oben beschriebenen Weise gereinigten und mit Alkohol behandelten Bierhefe mit 1500 ccm Wasser an, dem 250 ccm der bekannten, zur Phosphorsäurebestimmung dienenden «Magnesiamixtur» beigemischt waren, und ließ nun das Ganze 5 Tage lang bei niedriger Temperatur stehen, bevor filtrirt wurde.

<sup>1)</sup> Die Bestimmung ging leider verloren.

Allerdings gab dieses erste Extrakt, nachdem es klar filtriert und im Vacuum eingedampft worden war, mit Alkohol einen Niederschlag, der nach dem Trocknen und Verbrennen weniger Asche hinterließ, als die oben angeführten Präparate: allein bei wiederholtem Extrahieren mit der gleichen Flüssigkeit stieg der Aschen- und Phosphorsäuregehalt der Präparate von neuem, so daß ich weitere Versuche dieser Art aufgab.

Wenn weiter oben mit Bedauern bemerkt werden mußte, daß die aus reiner Preßhefe gewonnenen Invertinpräparate unter dem Einflusse von Ammoniak sehr bald ihre Wirksamkeit verlieren, so ist in Betreff der Bierhefe zu bekennen, daß sämtliche aus ihr bereiteten Extrakte, noch ehe sie durch Eindampfen im Vacuum konzentriert und vom überschüssigen Ammoniak befreit worden waren, bereits ein großes Inversionsvermögen besaßen, sodaß wir in der Tat schließen dürfen, daß das Invertin gewöhnlicher Bierhefe durch Ammoniak entweder gar nicht oder doch jedenfalls sehr viel weniger geschädigt wird, als das der Preßhefe.

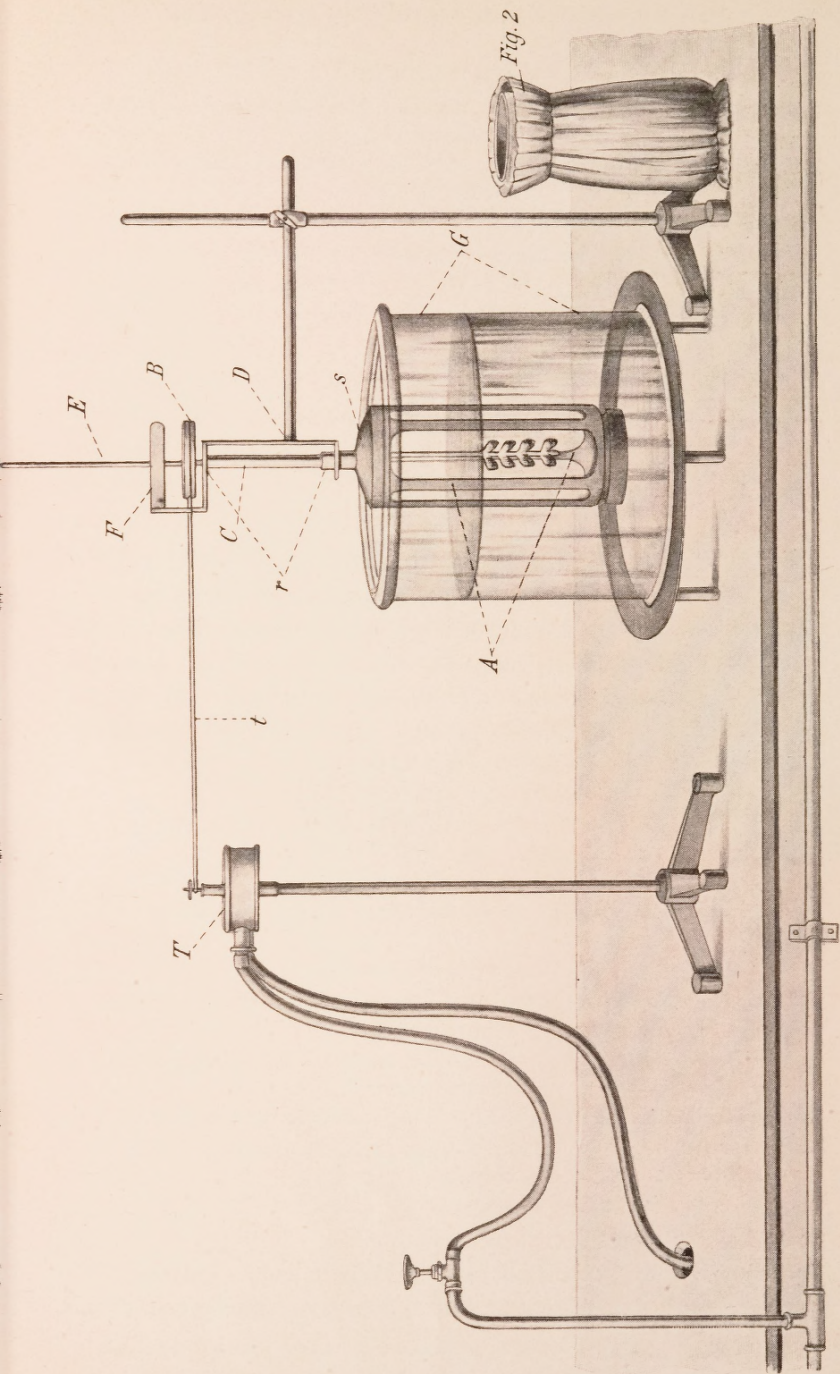
Nun wurden zwei aus verschiedenen Portionen der Bierhefe gewonnene Rohpräparate einzeln der Reinigung unterworfen. Diese geschah in der gleichen Weise wie bei den Rohpräparaten der Preßhefe. Ich verweise deshalb auf die oben gegebene ausführliche Beschreibung und wiederhole hier nur, daß das Wesentliche daran in der durch Zusatz von Ammoniak zur filtrierten wässerigen Lösung bewirkten Ausfällung von Ammonium-Magnesiumphosphat und in der darauffolgenden, mehrere Tage, ja Wochen lang fortgesetzten Dialyse bestand.

Vom ersten Präparate wurden 100 g in dieser Weise verarbeitet. Die Dialyse dauerte 12 Tage, während welcher das Außenwasser jeden Tag gewechselt wurde. Ich erhielt zum Schlusse aus der Innenflüssigkeit ein sehr leichtes, hellgraues, stark wirksames Pulver — ich will es als Invertin I bezeichnen —, das bei der Veraschung und Elementaranalyse folgende Zahlen gab.

#### Aschenbestimmung.

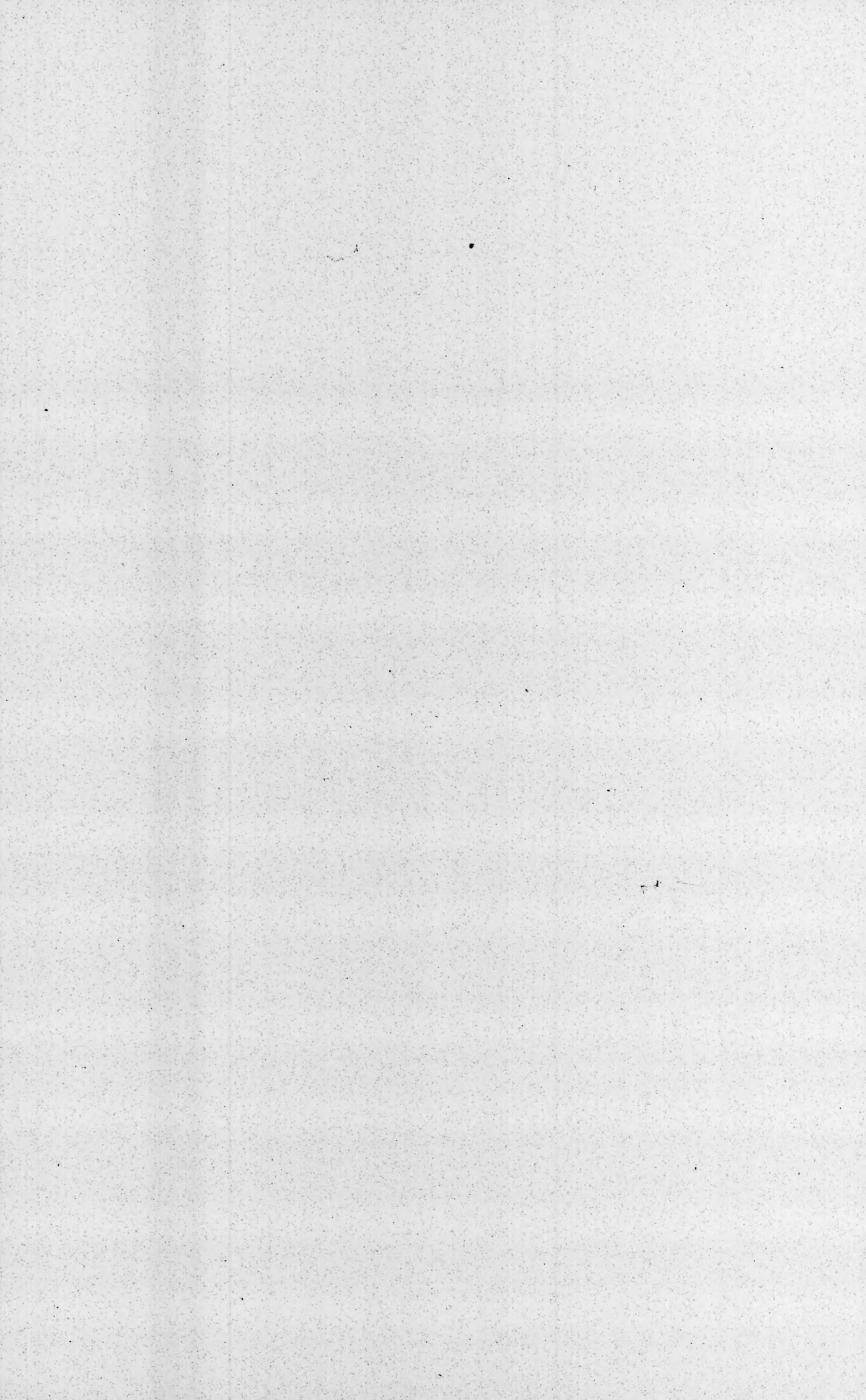
1. 0.9784 g Trockensubstanz hinterließen 0.1453 g, entspr. 14.86% Asche;
2. 0.1453 g Asche enthielten 0.1205 g  $P_2O_5$ , entsprechend 82.93%  $P_2O_5$  oder 36.20% P.





Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band XLII, Tafel 1.  
 Zu «B. Hafner, Einige Beiträge zur Kenntnis des «Invertins» der Hefe.»

Vorlag von Karl J. Trübner in Strassburg.



## Elementaranalyse.

1. 0.2286 g Trockensubstanz lieferten 0,1303 g Wasser und 0,3415 g Kohlensäure;
2. 0.2074 g Trockensubstanz lieferten 0,1158 g Wasser und 0,3079 g Kohlensäure;
3. 0.1803 g Trockensubstanz gaben nach Kjeldahl 0,0113 g Stickstoff.

Demnach enthielt die aschenfreie Substanz:

C	47.83%	47.56%	—
H	7.48%	7.33%	—
N	—	—	7.36%

Vom 2. Rohpräparate wurden 250 g der Reinigung unterworfen. Die Dialyse dauerte 5 Tage. Die Ausbeute an trockenem, stark wirksamem Pulver aus der Innenflüssigkeit — es sei als Invertin IIa bezeichnet — betrug 32 g.

## Aschenbestimmung.

9.4148 g Trockensubstanz hinterließen 0,6726 g, entspr. 7,14% Asche.

Da es auf die Beantwortung der Frage ankam, ob etwaige Daten dafür sprechen, daß der Phosphor der Asche wenigstens teilweise organisch gebunden gewesen, so habe ich in diesen, wie in den folgenden Aschen die wesentlichen Bestandteile quantitativ bestimmt. Ich fand in 0,6352 g derselben

P <sub>2</sub> P <sub>5</sub>	0,4747 g =	74,74%
SO <sub>3</sub>	0,0444 » =	6,99%
K <sub>2</sub> O	0,0955 » =	15,03%
MgO	0,0105 » =	1,65%
		<hr/> 98,41%

Die Asche enthielt außerdem noch Spuren von Calcium und von Eisen.

## Elementaranalyse.

1. 0.2073 g trockener Substanz lieferten 0,1370 g Wasser und 0,3196 g Kohlensäure;
2. 0.1954 g trockener Substanz lieferten 0,1255 g Wasser und 0,3015 g Kohlensäure;
3. 0.3076 g trockener Substanz gaben nach Kjeldahl 0,01953 g Stickstoff.

Das aschenfreie Präparat enthielt also:

C	45.28%	45,65%	—
H	7.96%	7,79%	—
N	—	—	6,94%

Ich habe oben angeführt, daß die Dialyse im letzten Falle nur 5 Tage lang fortgesetzt wurde. Es geschah dies aus Be-

sorgnis davor, daß bei längerer Dauer derselben der Verlust an wirksamer Substanz zu groß werden möchte. In der Tat zeigte sich das Außenwasser trotz vollkommener Dichtigkeit der Membran schon vom 2. Tage an wirksam. Deshalb wurden auch sämtliche täglich erneuerten Außenwasser vom 2.—5. Tage im Vacuum unter  $40^{\circ}$  eingedampft. Als ich aber versuchte, aus dem dunkelbraunen Rückstand das wirksame Invertin mit Alkohol wie sonst als pulverigen Niederschlag zu fällen, erhielt ich statt dessen, selbst wenn ich einen noch so großen Überschuß an Alkohol zufügte, eine auf dem Boden des Becherglases sich absetzende braune ölige Masse, die auch bei längerem Verweilen unter Alkohol nicht fest werden wollte. Dieselbe besaß indessen ein sehr starkes Inversionsvermögen: ein einziger Tropfen davon, zu 12 ccm einer 1,5%igen Rohrzuckerlösung in einem Probiergläschen zugefügt, wirkte bei bloßer Zimmertemperatur so rasch, daß die Lösung schon nach einer halben Minute Fehlingsches Reagens energisch reduzierte.

Da sich diese Masse auch durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Wiederfällen mit Alkohol nicht in einen pulverigen Niederschlag verwandeln ließ, so wurde sie nunmehr in eine große Kristallisierschale gegossen und 2 Wochen hindurch im Vacuum über konzentrierter Schwefelsäure sich selbst überlassen. Als sich auch dann etwas Festes nicht ausscheiden wollte, drängte sich mir die Vermutung auf, daß die Ursache hiervon wohl in der zu großen Menge gleichzeitig anwesender anorganischer Salze liegen könne. Die ölige Masse wurde deshalb in 50 ccm Wasser aufgenommen und diese Lösung nochmals, aber nur 10 Stunden lang, in einem kleineren Apparate der Dialyse unterworfen, unterdessen aber das Außenwasser 4mal erneuert.

Auf diese Weise ließ sich allerdings eine große Menge Salz entfernen; aber freilich ging gleichzeitig auch viel wirksames Ferment verloren. Am Ende fiel aber doch aus der im Innern zurückgebliebenen Lösung auf Zusatz von viel absolutem Alkohol eine reichliche flockige Masse aus, die nach Entfernung der überstehenden Flüssigkeit noch mehrmals mit absolutem Alkohol übergossen, zuletzt auf einem Filter gesammelt, mit

Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet wurde. Das trockene Präparat zerfiel zu einem leichten, bräunlich gefärbten Pulver, das sich trotz der langen Behandlung mit absolutem Alkohol doch noch recht wirksam erwies. Das Präparat heiße Invertin IIb. Die Gesamtausbeute davon betrug 7,5 g.

Von dieser Menge wurde zunächst wieder ein Teil zur Bestimmung des Gehaltes an Asche und zu deren Analyse benutzt.

#### Aschenbestimmung.

2,8698 g trockener Subst. hinterließen 0,6327 g, entsprechend 22,04% Asche.

In 0,4475 g dieser Asche wurden gefunden:

P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,3104 g,	entsprechend 69,37 %
SO <sub>3</sub>	0,0526 »	11,76 %
K <sub>2</sub> O	0,0817 »	18,27 %
MgO	0,0102 »	2,27 %
		<hr/> 101,67 %

#### Elementaranalyse.

- 0,2362 g Trockensubst. lieferten 0,1412 g Wasser u. 0,2908 g Kohlensäure.
- 0,2212 g Trockensubst. lieferten 0,1306 g Wasser u. 0,2725 g Kohlensäure.
- 0,2815 g Trockensubstanz gaben nach Kjeldahl 0,0198 g Stickstoff.

Die aschenfreie Substanz enthielt demnach

C	43,56 %	43,09 %	—
H	8,57 %	8,47 %	—
N	—	—	9,02 %

Ein anderer Teil des Präparates IIb diente zur Entscheidung der Frage, ob auch in ihm, das ja so leicht durch die Poren des Pergamentpapiers hindurch diffundiert war, ein Kohlenhydrat enthalten sei. Zu diesem Zwecke habe ich etwa 2 g davon in einem mit Rückflußkühler versehenen Kochkolben 12 Stunden lang mit 30 ccm 5%iger Schwefelsäure auf dem Drahtnetze erhitzt, alsdann die Lösung von der schwärzlichen Ausscheidung abfiltriert und nach dem Verdünnen mit Wasser auf dem Wasserbade allmählich mit frisch gefälltem Baryumkarbonat neutralisiert. Nachdem auch vom Baryumsulfat und dem Überschuß des Baryumkarbonats abfiltriert war, wurde der Niederschlag mit warmem Wasser ausgewaschen, das Filtrat samt Waschwasser im Vacuum bis zu einem geringen Volumen eingedampft und in den Rest die 6fache Menge Alkohols eingegossen. Nachdem ich das Ganze über Nacht ruhig stehen gelassen, nachträglich ausgeschiedenes Baryumsalz durch erneute

Filtration entfernt und das Filtrat im Vacuum wieder bis zum Sirup eingedickt hatte, ließ sich in der Tat aus diesem Sirup durch Zusatz von 5 ccm Phenylhydrazin und Essigsäure wiederum ein Hydrazon ausfällen, das beim Umkristallisieren aus heißem verdünnten Alkohol jene rötlichen Kristalle lieferte, die für das Hydrazon der Mannose so charakteristisch sind und deren Schmelzpunkt (195—198°) auch mit jenem des Mannosehydrazons übereinstimmt.

Betreffs der großen Schwankungen im Stickstoffgehalte der gereinigten Präparate wurde der Verdacht rege, daß in manchen Fällen ein Teil desselben von jenem Ammoniak herühren möge, das zum Zwecke der Ausfällung von Ammoniummagnesiumphosphat zur Lösung des Rohinvertins überschüssig zugefügt worden war, und das nun vielleicht in salzartiger Verbindung irgendwo an organisch oder sonstwie gebundener Phosphorsäure hängen geblieben sei, derartig, daß weder die Dialyse noch die spätere Ausfällung der Substanz mit Alkohol es habe entfernen können.

Um darüber Aufschluß zu erhalten, ob und wieweit diese Vermutung berechtigt sei, versuchte ich ein neues Rohpräparat aus Bierhefe, und zwar 81 g davon, ohne Ammoniakzusatz zu seiner Lösung, also ohne vorherige Ausfällung von Tripelphosphat, sogleich durch länger fortgesetzte Dialyse zu reinigen. Nachdem die Dialyse 7 Tage gedauert hatte, wurde zunächst das Ferment aus der Innenflüssigkeit dargestellt. Die Menge desselben betrug nach dem Trocknen 15,5 g. Ich will es Invertin IIIa nennen.

Vom dritten Tage der Dialyse ab wurde auch das täglich erneuerte Außenwasser gesammelt und eingedampft. Der daraus durch Zusatz von sehr viel absolutem Alkohol erhaltene flockige Niederschlag stellte gewaschen und getrocknet wieder ein lockeres, bräunliches, wirksames Pulver dar — es sei Invertin IIIb genannt —, dessen Gewicht zufälligerweise ebenfalls 15,5 g betrug.

Vom Invertin IIIa (aus der Innenflüssigkeit) hinterließen bei der

#### Aschenbestimmung

4.6138 g Trockensubstanz 0.8667 g, entsprechend 18.78 % Asche; und in 0.7854 g dieser Asche wurden gefunden

P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.5711 g.	entsprechend	72.71 ‰
SO <sub>3</sub>	0.0096	»	0.75 ‰
K <sub>2</sub> O	0.0930	»	11.84 ‰
CaO	0.0196	»	2.49 ‰
MgO	0.0868	»	11.05 ‰
			<hr/> 98.84 ‰

Dazu kamen noch Spuren von Eisen.

#### Elementaranalyse.

- 0.2337 g trockener Substanz lieferten 0.1306 g Wasser und 0.2917 g Kohlensäure;
- 0.2101 g trockener Substanz lieferten 0.1183 g Wasser und 0.2594 g Kohlensäure;
- 0.3495 g trockener Substanz gaben nach Kjeldahl 0.02264 g Stickstoff.

Hiernach enthielt das aschenfreie Präparat

C	42.00 ‰	41.47 ‰	—
H	7.71 ‰	7.75 ‰	—
N	—	—	7.97 ‰

Dagegen erhielt ich bei Invertin IIIb (aus dem Diffusate) die folgenden Resultate.

#### Aschenbestimmung.

6.4953 g trockener Subst. hinterließen 3.4714 g Asche, entsprechend 53.44 ‰.

In 3.0218 g derselben fanden sich

P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1.7141 g.	entsprechend	56.72 ‰
SO <sub>3</sub>	0.1085	»	3.59 ‰
K <sub>2</sub> O	1.0142	»	33.56 ‰
CaO	0.0118	»	0.39 ‰
MgO	0.2043	»	6.76 ‰
			<hr/> 101.02 ‰

#### Elementaranalyse.

- 0.3685 g trockener Substanz lieferten 0.1340 g Wasser und 0.1985 g Kohlensäure;
- 0.3650 g trockener Substanz lieferten 0.1383 g Wasser und 0.1933 g Kohlensäure;
- 0.5254 g trockener Substanz gaben nach Kjeldahl 0.0238 g Stickstoff.

Die aschenfreie Substanz enthielt demnach

C	31.54 ‰	31.01 ‰	—
H	8.74 ‰	9.10 ‰	—
N	—	—	9.72 ‰

Hier ist das Sinken des Kohlenstoffgehalts und dafür das Steigen des Wasserstoff- und Stickstoffgehalts in der Tat auffallend groß.

In einem zweiten, in gleicher Weise durchgeführten Versuche, das Rohinvertin durch bloße Dialyse zu reinigen, bei welchem 160 g davon verwandt wurden, erhielt ich aus der Innenflüssigkeit 22,4 g, aus dem Diffusate 7,5 g eines trockenen wirksamen Pulvers. Das erste mag Invertin IVa, das zweite Invertin IVb heißen. Die Dialyse hatte 8 Tage gedauert; die Außenwasser waren aber erst vom 4. Tage ab gesammelt und eingedampft worden.

Folgendes sind die Ergebnisse der Analysen.

### Invertin IVa.

#### Aschenbestimmung.

5.6914 g trockener Substanz hinterließen 0,9829 g, entspr. 17,27% Asche.

In 0,8171 g dieser Asche wurden gefunden:

P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,5473 g, entsprechend	66,98%
SO <sub>3</sub>	0,0197 »	2,41%
K <sub>2</sub> O	0,0422 »	5,16%
CaO	0,0126 »	1,54%
MgO	0,1728 »	21,14%
Eisen	Spuren	—
		97,23%

#### Elementaranalyse.

- 0,2350 g trockener Substanz lieferten 0,1390 g Wasser und 0,2893 g Kohlensäure;
- 0,2538 g trockener Substanz lieferten 0,1459 g Wasser und 0,3141 g Kohlensäure;
- 0,3212 g trockener Substanz gaben nach Kjeldahl 0,02124 g Stickstoff.

Hiernach enthielt die aschenfreie Substanz:

C	40,58%	40,80%	—
H	7,99%	7,77%	—
N	—	—	7,99%

### Invertin IVb.

#### Aschenbestimmung.

2,7251 g trockener Substanz hinterließen 1,1401 g Asche, entspr. 41,83%.

In 0,7644 g dieser Asche waren enthalten:

P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,5093 g, entsprechend	66,62%
SO <sub>3</sub>	0,0026 »	0,34%
K <sub>2</sub> O	0,1963 »	25,68%
CaO	0,0124 »	1,62%
MgO	0,0388 »	4,03%
Eisen	Spuren	—
		98,29%



## Elementaranalyse.

1. 0.3853 g trockener Substanz lieferten 0.2095 g Wasser und 0.3372 g Kohlensäure:
2. 0.2363 g trockener Substanz gaben nach Kjeldahl 0.02026 g Stickstoff.

Demnach enthielt die aschenfreie Substanz:

C	41.03%	—
H	10.45%	—
N	—	15.08%

Aus den letzten Versuchen, bezw. Analysen, geht hervor, daß die Reinigung der Rohpräparate durch bloße Dialyse die Schwankungen im Stickstoffgehalt der reineren Präparate durchaus nicht beseitigt hat.

Zum gegenseitigen Vergleiche habe ich aber in folgender Tabelle die bei den verschiedenen aus Bierhefe dargestellten und auf verschiedene Weise gereinigten Invertinen gefundenen analytischen Resultate, soweit diese sich auf den Gehalt an Asche und auf die in dieser jedesmal enthaltenen Mengen von Phosphorsäureanhydrid, Kaliumoxyd, Magnesiumoxyd etc. beziehen, zusammengestellt.

Nummer des Präpa- rats	Aus der Innenflüssigkeit						Nummer des Präpa- rats	Aus dem Außenwasser					
	Prozent- gehalt an Asche	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	MgO		Prozent- gehalt an Asche	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	MgO
I	14.86	82.93	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IIa	7.14	74.74	6.99	15.03	—	1.65	IIb	22.04	69.37	11.76	18.27	—	2.27
IIIa	18.78	72.71	0.75	11.84	2.49	11.05	IIIb	53.44	56.72	3.59	33.56	0.39	6.76
IVa	17.27	66.98	2.41	5.16	1.54	21.14	IVb	41.83	66.62	0.34	25.68	1.62	4.03

Man sieht aus dieser Tabelle zunächst, daß der Aschengehalt der aus dem Innern des Dialysators stammenden Präparate, wie zu erwarten, durchgängig geringer als derjenige der aus dem Diffusate gewonnenen Invertine ist; man sieht aber ferner den Einfluß, den die vor der Dialyse vorgenommene Ausfällung des Tripelphosphats auf den Aschengehalt ausübt; er ist, wo dieses geschehen, wesentlich kleiner, und endlich

<sup>1)</sup> Ohne vorherige Ausfällung von Tripelphosphat sofort der Dialyse unterworfen.

zeigt sich, daß namentlich die Kalisalze bei der Dialyse reichlich nach außen diffundiert sind. Man halte nur die Zahlen 18,27: 33,56; 25,68 gegen 15,03: 11,84: 5,16.

Auf die Resultate der Elementaranalysen ist nur insofern einiges Gewicht zu legen, als sie den Sinn andeuten, in welchem während der Dialyse eine Änderung des Stoffgemenges vor sich gegangen ist. Indessen läßt der Umstand, daß die mit Invertin IIb, IIIa, IIIb, IVa und IVb bezeichneten Präparate, auf aschenfreie Substanz berechnet, einen merklich geringeren Gehalt (besonders IIIb) an Kohlenstoff, dagegen einen etwas höheren an Stickstoff aufweisen, als die mit I und IIa bezeichneten, doch zu verschiedene Deutungen zu, als daß es sich lohnt, sich bei ihrer Erörterung jetzt schon aufzuhalten.

Dagegen sind nun die Resultate der Aschenanalysen vollkommen eindeutig und wohl geeignet, auf die erste Frage, die ich mir am Anfange dieser Untersuchung stellte, eine entschiedene Antwort zu geben. Diese lautet: Es ist bisher nicht gelungen, die Phosphorsäure, sei es auf dem Wege der Fällung als Tripelphosphat, sei es durch Dialyse aus einem wirksamen Invertinpräparate völlig zu entfernen: ja die quantitative Bestimmung derselben in den analysierten Aschen läßt sogar keinen Zweifel darüber zu, daß der Phosphor in meinen verschiedenen Präparaten zum großen Teile organisch gebunden war.<sup>1)</sup>

Rechnet man nämlich die in der Asche bestimmten Kalium-, Calcium- und Magnesiummengen auf Kalium-, Calcium- und Magnesiumphosphat um, so zeigt sich in der Tat, daß die Mengen, in welchen diese Basen vorhanden sind, zusammen bei weitem nicht hinreichen, den gesamten Phosphorsäurevorrat zu binden, und zwar selbst dann nicht, wenn man die gleichzeitig vorhandene Schwefelsäure<sup>2)</sup> unberücksichtigt läßt.

<sup>1)</sup> Natürlich bleibt andererseits die Frage unentschieden, ob dieser Phosphor zur wirksamen Gruppe des Ferments gehört, oder ob er von einer Substanz herrührt, die nur eine Verunreinigung der ersteren darstellt.

<sup>2)</sup> Die in der Asche gefundene Schwefelsäure rührt jedenfalls, da Eiweiß in den gereinigten Invertinpräparaten nicht enthalten ist, so wenig wie bleischwäzender Schwefel, von ursprünglich in der Hefe vorkommenden schwefelsauren Salzen her.

An einigen Beispielen kann man das leicht zeigen.

Ich wähle sogleich die Asche von Invertin IIa (S. 17), als die erste, deren wichtigste Bestandteile quantitativ bestimmt wurden.

In 100 Teilen derselben waren gefunden 15,03 Teile  $K_2O$  und 1,65 Teile  $MgO$ . Diese erfordern zur Bildung von  $K_3PO_4$  und  $Mg_2P_2O_7$  7,54, bzw. 2,90 Teile  $P_2O_5$ . Da aber die gleiche Asche 74,74%  $P_2O_5$  enthielt, so blieb ein Rest von  $74,74 - (7,54 + 2,90) = 64,30$  Gewichtsteilen  $P_2O_5$  ungedeckt.

In ähnlicher Weise verhält es sich mit der Asche von Invertin II b.

Diese enthielt 69,37%  $P_2O_5$ , 18,27%  $K_2O$  und 2,27%  $MgO$ ; die außerdem gefundene Schwefelsäure lasse ich absichtlich aus dem Spiele. 18,27 Teile  $K_2O$  verlangen zur Bildung von  $K_3P_2O_4$  9,17 Teile  $P_2O_5$ , und 2,27 Teile  $MgO$ , zur Bildung von  $Mg_2P_2O_7$  3,99 Teile  $P_2O_5$ . Also bleiben  $69,37 - (9,17 + 3,99) = 56,21$  Gewichtsteile  $P_2O_5$  übrig, die nicht durch Basen gedeckt sind.

Führt man diese Berechnung auch für die Aschen von IIIa, IIIb, IVa und IVb durch, so findet man in allen diesen Fällen ebenfalls einen erheblichen Überschuß an Phosphorsäure. Es bleiben ungedeckt:

in IIIa 47,35 Teile von 72,71 Teilen Gesamtphosphorsäure.

IIIb 28,00 „ „ 56,72 „ „

IVa 27,28 „ „ 66,98 „ „

IVb 46,66 „ „ 66,62 „ „

Man wird in der Annahme nicht fehlgehen, daß es sich mit den Aschen der beiden aus reiner Preßhefe dargestellten Invertinpräparate ebenso verhalten hat; denn deren Gehalt an  $P_2O_5$  betrug das eine Mal 81,54%, das andere Mal sogar 82,70% (vgl. S. 7 und 9).

Die zweite Frage, deren Beantwortung ich mir zur Aufgabe gesetzt hatte, die Frage, ob das in den bisher dargestellten Invertinpräparaten stets gefundene Kohlenhydrat ein integrierender Bestandteil des wirksamen Ferments oder nur eine Verunreinigung desselben sei, ist schon mehrfach erörtert worden. Sowohl Wroblewski

wie Salkowski und dessen Schüler Oshima haben sich für die letztere Annahme entschieden. Sie stützen sich dabei in erster Linie auf die zuerst von Salkowski<sup>1)</sup> gefundene Tatsache, daß die Hefezellen in reichlicher Menge ein eigentümliches Kohlenhydrat (Salkowskis «Hefegummi») enthalten, das sich durch Erhitzen mit Säure in Mannose umwandeln läßt, dieselbe Zuckerart, die zuerst Kölle<sup>2)</sup> durch Erhitzen seines nach W. A. Osborne gereinigten Invertinpräparates mit verdünnter Säure (Salz- oder auch Schwefelsäure) gewonnen hatte.

Die genannten Forscher haben sich auch bemüht, ein wirklich kohlenhydratfreies Ferment darzustellen: der erste, Wroblewski,<sup>3)</sup> indem er versuchte, es durch Sättigung seiner Lösung mit Ammonsulfat niederzuschlagen; Oshima,<sup>4)</sup> indem er das Gleiche von einem Zusatze von Kupferacetat erhoffte. Beide Resultate haben sich indessen nicht als unanfechtbar erwiesen.

Das wirksame Ferment ist, wie schon Barth, Osborne, Salkowski gezeigt haben, eben selbst kein Eiweißkörper, so daß denn auch schwefelsaures Ammon bei meinen eigenen Versuchen als Fällungsmittel jedesmal versagte.<sup>5)</sup> Essigsäures Kupfer ist aber zu einem solchen ebensowenig geeignet. Salkowski macht in seiner Abhandlung «über das Invertin der Hefe»<sup>6)</sup> die Bemerkung: «Kupfersulfat und -acetat bewirkte keine Fällung». Oshima dagegen erhielt zwar in 5 verschiedenen Versuchen nach genauer Neutralisierung seiner Lösungen bei Zusatz von Kupferacetat jedesmal einen Niederschlag, aus dem sich nach Entfernung des Kupfers mit Schwefelwasserstoff ein wirksames, grauweißes Pulver isolieren ließ, das nicht nur frei von Eiweiß, sondern — mit Ausnahme nur eines Falles — auch frei von Gummi war: allein er sagt selbst, daß die

<sup>1)</sup> B. B., Bd. 27, S. 497 ff.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 429.

<sup>3)</sup> B. B., Bd. 31, S. 1134.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 42.

<sup>5)</sup> Wroblewski hat sich später selbst davon überzeugt, daß «das Invertin nicht aussalzbar ist». Vgl. Journal f. pr. Chemie, Bd. 64 S. 1—68.

<sup>6)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 316.

Menge des Pulvers sehr gering gewesen und daß die Wirksamkeit desselben offenbar Schaden gelitten gehabt, sodaß man auch dieses Verfahren «keinen glatten Weg, um zu einem gummi-freien, gut wirksamen Präparate zu gelangen, nennen» könne.

Ich habe, da mir daran lag, über die Brauchbarkeit von Oshimas Methode ein eigenes Urteil zu gewinnen, 2 mal je 40 g Rohmaterial mit 32,4% Aschengehalt in 1 l Wasser gelöst, die Lösung genau mit Natriumkarbonat neutralisiert und dann so lange mit einer 5%igen Lösung von Kupferacetat versetzt, bis der dadurch erzeugte graublaue, voluminöse Niederschlag sich nicht mehr vermehrte. Nachdem ich hierauf diesen Niederschlag ganz nach Oshimas Vorschrift weiter behandelt, das Kupfer durch Schwefelwasserstoff entfernt, aus der vom Schwefelkupfer abfiltrierten Lösung den Schwefelwasserstoff durch Eindampfen im Vacuum bei 35° verjagt und die eingedampfte Flüssigkeit bis zur milchigen Trübung mit absolutem Alkohol versetzt hatte, schied sich über Nacht in der Tat ein gelblich-weißes Pulver aus, das in üblicher Weise auf einem Filter gesammelt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet werden konnte. Das Gewicht der Trockensubstanz betrug im ersten Falle 0,95 g. Dieselbe war in Wasser leicht löslich und gab allerdings weder die Salkowskische Gummireaktion noch die Biuretreaktion. Ihre Wirksamkeit war indessen eine ganz minimale:

Um wenigstens soviel festzustellen, ob durch das Kupferacetat eine Substanz isoliert worden war, die mehr oder weniger Kohlenstoff bezw. Stickstoff enthielt, als meine sogenannten gereinigten Invertine, benutzte ich einen Teil des Pulvers zu einer Aschenbestimmung, den Rest aber wieder zu einer Bestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff.

#### Aschenbestimmung.

0.1734 g trockener Substanz hinterließen 0.0920 g Asche; entsprechend 53.06%, und letztere besaß wiederum, wie wenigstens ein qualitativer Versuch bewies, einen reichlichen Gehalt an Phosphorsäure.

#### Elementaranalyse.

1. 0.2161 g trockener Substanz lieferten 0.0812 g Wasser und 0.1234 g Kohlensäure;

2. 0.2028 g trockener Substanz lieferten 0,0785 g Wasser und 0,1149 g Kohlensäure ;
3. 0,1300 g trockener Substanz gaben nach Kjeldahl 0,0081 g Stickstoff.  
Die aschenfreie Substanz enthielt demnach:

C	33,15%	32,93%	—
H	8,95%	9,32%	—
N	—	—	13,23%

Vergleicht man diese Daten mit den entsprechenden für die Reinvertine<sup>s</sup> gemeinhin erhaltenen Zahlen, so ist der Unterschied im Aschengehalte nicht minder auffällig, wie der im Gehalte an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff. Während jener, sowie der Gehalt an Wasserstoff und Stickstoff sehr bedeutend erhöht, ist der Kohlenstoffgehalt nicht unbeträchtlich vermindert.

Es war nun interessant, zu erfahren, was denn aus der Lösung des Rohinvertins durch den Zusatz von Kupferacetat nicht gefällt worden war.

Zu diesem Zwecke wurde in das Filtrat vom Kupferniederschlage gleichfalls Schwefelwasserstoff eingeleitet und die vom Kupfersulfid getrennte Lösung wie oben im Vacuum bei 35° zugleich von Schwefelwasserstoff befreit und auf ein kleines Volumen eingedampft.

Es blieb ein braunes Extrakt zurück, das nach einigem Stehen zunächst noch etwas Schwefelkupfer ausfallen ließ, aus dem aber, nachdem das letztere abfiltriert worden, durch Zusatz etwa der 10fachen Menge absoluten Alkohols ein schwach gelbgefärbter Niederschlag ausgefällt werden konnte, der gesammelt und getrocknet ganz das Aussehen des Rohinvertins besaß, die Salkowskische Gummireaktion gab, aber auch entschieden invertierend wirkte.

Die Gesamtmenge des trockenen Pulvers betrug 17 g, dessen Aschengehalt war = 41,60%, also immer noch größer als der des angewandten Rohinvertins (32,4%), woraus man schließen darf, daß durch den Zusatz von Alkohol zum Extrakt wohl der größte Teil der Asche, nicht aber alle organische Substanz, die darin gelöst gewesen, gefällt worden war.

In einem zweiten Versuche, zu dem ebensoviel Rohinvertin (40 g) wie im ersten verwandt, in dem aber der Kupfernieder-

schlag sorgfältiger ausgewaschen wurde, so lange, bis das Waschwasser nicht mehr gefärbt abfloß — wozu im ganzen 2 l Wasser nötig waren —, erhielt ich aus dem Kupferniederschlag nach Zersetzung desselben mit Schwefelwasserstoff abermals einen pulverförmigen Niederschlag, der anfangs durch sein großes Volumen ein Gewicht von mindestens 15 g vortäuschte, aber beim Trocknen im Vacuum zu einem Häufchen von nur 1.4 g trockner Substanz einschrumpfte. Dieselbe besaß wiederum einen enormen Aschengehalt, nämlich 50,77<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; und enthielt nach dem Ergebnis der Elementaranalyse in aschenfreiem Zustande im Mittel nur 26,0<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Kohlenstoff, 7,3<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Wasserstoff und 9,0<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Stickstoff. Sie war in der Tat ganz frei von Kohlenhydrat, war aber auch ganz unwirksam.

Nach diesen Erfahrungen ist Zusatz von Kupferacetat zur Lösung in der Tat nicht geeignet, die gehoffte Trennung der wirksamen Substanz vom Hefegummi herbeizuführen.

Wenn Oshimas Bemühungen und ebenso der erste meiner eigenen Versuche anscheinend ein positives Resultat ergeben haben, so rührte das wohl nur daher, daß der voluminöse kupferhaltige Niederschlag allerdings Spuren des wirksamen Ferments mechanisch mit niedergerissen hat, was andere voluminöse Niederschläge ja auch tun; allein solche Spuren, die sich übrigens durch längeres Auswaschen entfernen lassen, sind eben nicht geeignet und genügend, die chemische Natur ihrer Substanz in unzweideutiger Weise erkennen zu lassen.

Wroblewskis und Oshimas Bestreben ging dahin, bloß das Ferment zu fällen, das Kohlenhydrat aber in der Lösung zu belassen. Man könnte umgekehrt versuchen, das Kohlenhydrat zu fällen, während das Ferment in Lösung bleibt. Man könnte z. B. daran denken, das Hefegummi nach Salkowskis Methode mit Fehlingscher Lösung niederschlagen zu wollen, allein die Berührung des Ferments mit diesem Reagens müßte, da letzteres stark alkalisch ist, die Wirksamkeit desselben augenblicklich zerstören.

So blieb als letzte Hoffnung, das gewünschte Ziel zu erreichen, nur der Versuch übrig, das Kohlenhydrat selber durch irgend ein geeignetes Ferment in die Form eines alkohollöslichen

Zuckers umzuwandeln, von dem sich dann die invertierende Gruppe als unlöslich in Alkohol vielleicht trennen ließe.

Mehrere Versuche mit einer kräftig wirkenden, aus Grünmalz frisch bereiteten Diastase, deren eventueller Einwirkung ich jedesmal 5 g Rohinvertin, gelöst in 200 ccm Wasser, bei einer Temperatur von 40° und während einer Zeitdauer von 6 Stunden bis zu 2 Tagen unterwarf, hatten alle einen negativen Erfolg: das aus der Lösung zurückgewonnene Invertin war nach wie vor «gummihaltig».

Auch die Hefe selbst, die zwar nach Koch und Hosaeus<sup>1)</sup> der Nährlösung zugesetztes Glykogen weder zu assimilieren noch zu vergären imstande ist, wohl aber nach Lintner<sup>2)</sup> bei der Selbstgärung ihren eigenen Glykogengehalt vollständig verbraucht, zeigte sich bei einem entsprechenden Versuche außerstande, ihren eigenen Gummigehalt zu vergären. Aus 2500 g Bierhefe, die in 2 l Wasser aufgeschwemmt 15 Tage lang bei ungefähr 30° der Selbstgärung überlassen worden waren, konnte ich in üblicher Weise 15,5 g eines weißen aschenreichen Pulvers darstellen, das wohl sehr wirksam, aber auch wie gewöhnlich noch kohlenhydrathaltig war.

Auch ein mit Glyzerin bereitetes, stark wirksames Pankreasextrakt, in welchem bekanntlich alle 3 Fermente der Drüse, das amylytische, proteolytische und fettzerlegende, nebeneinander enthalten zu sein pflegen, hatte, als ich einen konzentrierten Hefeauszug länger als 1 Monat bei 25—30° damit in Berührung gelassen, das zu beseitigende Kohlenhydrat nicht in Zucker umgewandelt: denn das aus dem Gemische am Ende dargestellte Invertinpräparat, das obendrein noch ein ganz bedeutendes Inversionsvermögen besaß, reduzierte Fehlingsche Lösung erst nach mehrstündigem Kochen mit 5%iger Schwefelsäure.

Man sieht also, daß das sogenannte Hefegummi kein zerlegbares Objekt für unsere gewöhnlichen, die Polysaccharide angreifenden Fermente ist. Es ist ebenso unangreifbar für die Diastase der keimenden Samen, wie für die Amylase der Hefe

<sup>1)</sup> Zentralblatt für Bakteriologie, 1894, Bd. 16, S. 145.

<sup>2)</sup> Ebenda, 1899, Bd. 5, Nr. 23, 2. Abteilung, S. 793.



selbst und für das entsprechende Ferment des tierischen Pankreas.<sup>1)</sup>

Nach alledem läßt sich auf keinem der bisher eingeschlagenen Wege die Frage entscheiden, ob das wirksame Ferment unserer Invertine eine Kohlenhydratgruppe als integrierenden Bestandteil enthält oder nicht.

Aber was veranlaßt uns denn eigentlich, den Gedanken, daß dies tatsächlich der Fall sein könne, so sicher von der Hand zu weisen?

Beruhet es nicht vielmehr auf einer völlig grundlos vorgefaßten Meinung — ich hege in der Tat die gleichen häretischen Bedenken, wie W. A. Osborne —, wenn wir uns darauf versteifen, durchaus ein Invertin darstellen zu wollen, das von jeglichem Kohlenhydrat frei ist? Wer gibt uns das Recht, ein wirksames Präparat deshalb ohne weiteres unrein zu nennen, weil es nach dem Kochen mit Säuren Fehlingsche Lösung reduziert? Warum darf denn das wirksame Ferment kein Kohlenhydrat als integrierenden Bestandteil enthalten? Wer von uns allen kann überhaupt sagen, wie das reine Ferment zusammengesetzt sein muß oder wie es nicht zusammengesetzt sein darf? Wer kann entscheiden, ob und wie viel oder wenig Stickstoff es enthalten muß? Ferner, ob es Phosphor enthalten darf oder nicht?

Die Art der Wirkung eines Ferments liefert uns jedenfalls nach unsern bisherigen Kenntnissen für irgend eine bestimmte Meinung hierüber gar keinerlei Anhalt.

Die Hauptschwierigkeit für alle unsere Versuche, den chemischen Bau eines wirksamen Ferments zu ergründen, ist und bleibt leider immer ihre große Empfindlichkeit und Labi-

<sup>1)</sup> Das Ergebnis des letzten Versuchs, die Tatsache, daß trotz der monatelangen Einwirkung des Trypsins auf den Hefeauszug dennoch das Inversionsvermögen desselben vollkommen erhalten geblieben, ist aber auch insofern wichtig und interessant, als es einen entschiedenen Beweis gegen die Annahme liefert, das Invertin könne zu den eiweißartigen Substanzen gehören. — Daß das Invertin weder durch das im Hefesaft selbst befindliche proteolytische Enzym, noch durch das Trypsin zerlegt wird, hat auch Wroblewski beobachtet. Vgl. Journal für pr. Chemie, Bd. 64, S. 39.

lität: der Umstand, daß sie in gelöstem, ja auch nur feuchtem Zustande in der Regel bereits bei wenig über 50° erhöhter Temperatur und ebenso schon bei Berührung mit verhältnismäßig schwachen Säuren<sup>1)</sup> und Laugen an Wirksamkeit verlieren, sodaß uns die meisten Eingriffe und Operationen, durch die der Chemiker sonst seine Körper zu isolieren pflegt, für den gleichen Zweck hier untersagt sind: denn dafür, daß wir den gesuchten Stoff wirklich unter den Händen haben, besitzen wir nun einmal kein anderes Kriterium, als eben seine Wirksamkeit.

Um auf die dritte Frage, die ich mir gestellt hatte, auf die nach der Herkunft des Stickstoffs der üblichen Präparate, eine Antwort zu erhalten, kochte ich mehrere Proben des gereinigten Invertins und zwar das eine Mal 10, ein zweites Mal 30, ein drittes Mal 45 g davon eine Stunde lang über freiem Feuer mit je  $\frac{1}{2}$  l 2,5%iger Schwefelsäure.<sup>2)</sup> Nachdem dies geschehen, versetzte ich die braun gewordene Flüssigkeit so lange mit einer Lösung von Phosphorwolframsäure in 5%iger Schwefelsäure, bis sich kein neuer Niederschlag mehr bildete, und suchte nun in bekannter Weise etwaige stickstoffhaltige Stoffe sowohl aus dem Niederschlage, wie aus dem Filtrate davon, zu isolieren. Aber in jedem Falle waren die Ausbeuten an stickstoffhaltiger Substanz nur äußerst gering und die Resultate der Analyse, die ich trotzdem wagte, waren durchaus nicht eindeutig und entscheidend, fordern indessen umsomehr zu erneuten Versuchen mit größeren Mengen wirksamer Substanz auf, als sich ergab, daß die Phosphorwolframsäure stickstoffhaltige Körper gefällt hatte, die auch mit ammoniakalischer Silberlösung Niederschläge gaben, deren Stickstoffgehalt nicht unbeträchtlich war.

Das dritte wirksame Präparat, das mit Schwefelsäure gekocht wurde, stammte aus dem Außenwasser des Dialysators. Eine geringe Menge eines stickstoffhaltigen, kristallinen

<sup>1)</sup> Vgl. die betreffenden Beobachtungen Osbornes a. a. O.

<sup>2)</sup> Es dürfte gut sein, bei Fortsetzung dieser Versuche das Kochen zunächst ganz zu unterlassen und die saure Lösung ohne weiteres mit Phosphorwolframsäure zu versetzen.

Körpers, der hier aus dem Filtrate vom Phosphorwolframsäure-niederschlag isoliert werden konnte, lieferte bei der Verbrennung Zahlen für die Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffprocente, die man zur Not auf ein Gemenge von Amidovaleriansäure und Leucin deuten konnte. Nun ist es ja möglich, daß die beiden Körper, wenn sie wirklich vorhanden waren, erst infolge der Zersetzung größerer Moleküle durch die kochende Schwefelsäure entstanden sind: aber es ist ebenso möglich, daß die beiden schon fertig bei der Extraktion der Hefe mit Wasser in Lösung gingen, später gleichzeitig mit dem Fermente gefällt und wieder gelöst wurden, endlich abermals in Gesellschaft des Ferments die Pergamentmembran passierten und zuletzt von neuem mit ihm zugleich niedergeschlagen wurden.

#### Zusammenfassung der wichtigsten Resultate.

1. Was den Aschengehalt sowohl der aus rein gezüchteter Preßhefe, wie aus gewöhnlicher Bierhefe dargestellten Invertinpräparate betrifft, so kann man denselben, wie schon O'Sullivan und Tompson, Osborne und Kölle zeigten, ohne daß deshalb die Wirksamkeit der Präparate Schaden leidet, durch Dialyse sehr herabdrücken, aber bisher niemals ganz beseitigen. Wahrscheinlich gehören die Basen der Asche — jedenfalls ihrer Hauptmenge nach — nicht zur Konstitution des wirksamen Enzyms. Da aber durch das Ausfällen der Phosphorsäure als Ammonium-Magnesiumphosphat und durch nachfolgende Dialyse jedesmal Präparate gewonnen werden, die beim Veraschen mit Barytwasser wenig eigene Asche zurücklassen, der Phosphorsäuregehalt der letzteren aber bis über 80% betragen kann, so liegt die Vermutung nahe, daß ein ziemlich großer Teil des Phosphors in den Präparaten organisch gebunden ist. Durch eine mit den Daten der einzelnen Aschenanalysen vorgenommene einfache Rechnung wurde diese Vermutung als wahr erwiesen.

2. Wie mannigfache Versuche zeigten, ist es nach den bisher vorgeschlagenen Verfahren unmöglich, ein wirksames Invertinpräparat darzustellen, das völlig frei wäre von Kohlenhydrat. Da sich dieses Kohlenhydrat auch nicht durch Dialyse

beseitigen läßt, da es im Gegenteil bei der Dialyse immer zugleich mit der wirksamen Substanz durch die Pergamentmembran nach außen diffundiert, so ist es, solange nicht das Gegenteil unzweideutig bewiesen ist, nicht ungereimt, anzunehmen, daß wenigstens ein Teil dieses eigentümlichen Kohlenhydrats einen integrierenden Bestandteil des wirksamen Enzyms bildet.

3. Die spezifische Wirksamkeit des Ferments ist nicht gebunden an das Vorhandensein großer stickstoffhaltiger Gruppen, wie die Albumosen und Peptone; denn selbst nach wochenlanger Berührung mit einer kräftig wirkenden Trypsinlösung, bei einer Temperatur von 35°, wobei solche Gruppen gewiß weiter zerfallen wären, blieb die Wirksamkeit meiner Präparate noch immer energisch. Gegen die Anwesenheit von Peptonen spricht aber weiter das Fehlen der Biuretreaktion, die ich an den Lösungen meiner gereinigten Invertine niemals beobachten konnte.

Der Stickstoffgehalt der verschiedenen Invertinpräparate ist wahrscheinlich durch die Gegenwart kleinerer stickstoffhaltiger Gruppen bedingt, deren scharfe Isolierung und Charakterisierung vorderhand noch der Gegenstand weiterer Untersuchung ist. Möglicherweise ist das invertierende Enzym eine sehr kompliziert gebaute und deswegen auch sehr hinfällige, neben Stickstoff auch noch Phosphor enthaltende Substanz, worin die einzelnen Hydroxylgruppen der Phosphorsäure dazu dienen, sowohl kleinere stickstoffhaltige Gruppen, als auch Kohlenhydratreste, vielleicht daneben auch noch Kalium- und Magnesiumatome festzuhalten.

4. Vergleicht man am Ende die Resultate, die ich bei meinen Versuchen mit Preßhefe, mit denen, die ich beim Arbeiten mit gewöhnlicher Bierhefe erhalten habe, so zeigt sich zwar, daß die Bierhefe widerstandsfähigere, auch kräftiger wirkende Präparate geliefert hat; daß dagegen in bezug auf Gleichartigkeit in der Zusammensetzung die aus reiner Preßhefe dargestellten Präparate den Vorzug verdienen.

Deswegen dürfte es sich wohl auch empfehlen, bei künftigen Versuchen über die Natur des Invertins zur reinen Preßhefe zurückzukehren.