

Über einige Hefefermente.

Von

Dr. K. Shiga.

Aus dem physiologischen Institut zu Heidelberg.

(Der Redaktion zugegangen am 30. Juli 1907.)

I. Über die fermentative Umwandlung der Nucleinbasen.

Die Untersuchungen über die fermentative Bildung der Nucleinbasen in der Hefe begannen mit den Arbeiten von Schützenberger, welcher im Jahre 1874 zeigte, daß bei der Autodigestion der Hefe Xanthin, Hypoxanthin und Guanin (neben Carnin) entstehen. Weder Schützenberger noch Miescher, der Entdecker der Nucleinstoffe, erkannte aber den Ursprung dieser Alloxurbasen aus den Nucleinen. Erst durch die späteren Arbeiten von A. Kossel wurde gefunden, daß Hypoxanthin, Xanthin, Guanin und Adenin aus den Nucleinstoffen hervorgehen, und hierdurch wurden eine Reihe von Untersuchungen über die fermentative Bildung dieser Alloxurbasen aus den Nucleinstoffen der Hefe angeregt. In den Arbeiten von A. Kossel,¹⁾ V. Lehmann, E. Salkowski und seinen Schülern, Milroy,²⁾ Hahn und Geret, F. Kutscher, Araki,³⁾ W. Jones, Iwanoff⁴⁾ u. a. kondensierte sich mehr und mehr der Begriff eines nucleinsäurespaltenden Ferments (Nuclease).

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 14.

A. Kossel, Untersuchungen über die Nucleine und ihre Zer-
setzungsprodukte. Straßburg, 1881, S. 19.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 307.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 84.

⁴⁾ Literatur siehe bei W. Jones, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 35.

Ein wesentlicher Fortschritt wurde durch die Untersuchungen von Victor Lehmann bezeichnet. Derselbe zeigte im Jahre 1885, daß unter dem Einfluß der Selbstverdauung eine Umbildung der Alloxurbasen oder des die Alloxurbasen liefernden Teils vom Nucleinsäuremolekül vor sich geht. Bei seinen mit noch unvollkommener Methodik ausgeführten Versuchen zeigte sich eine Abnahme des Hypoxanthins und eine Zunahme des Xanthins oder der Summe von Xanthin und Guanin. Ein sehr bemerkenswertes Resultat lieferten auch die Untersuchungen von F. Kutscher,¹⁾ welcher bei der Autolyse der Hefe ebenso wie bei der Selbstverdauung des Pankreas nur Guanin und Adenin auffand, und endlich die Untersuchungen von W. Jones²⁾ und seinen Mitarbeitern, welche die Umbildung der Basen unter dem Einfluß autolytischer Fermente in Thymus, Milz, Nebennieren und anderen tierischen Geweben genau feststellten. Hieraus ergab sich, daß die Verhältnisse der Fermentwirkungen in den verschiedenen Organen recht komplizierte sein müssen.

Das Nucleoprotein der Thymusdrüse liefert nach W. Jones bei der Selbstverdauung Xanthin und eine geringe Menge Hypoxanthin neben Uracil, aber weder Guanin, noch Adenin noch Thymin, wiewohl die letzten drei Substanzen durch Wirkung von Mineralsäuren auf Thymusnucleinsäure entstehen. Bei der Selbstverdauung der Milz hingegen bildet sich Guanin ebenso gut wie bei der Hydrolyse der Nucleinsäure. Andererseits tritt hier Hypoxanthin bei der Autolyse auf, während man Adenin erwarten möchte, und Uracil findet sich statt Thymin und Cytosin, die bei der Hydrolyse der Nucleinsäure gebildet werden.

Ich teile im folgenden kurz die Resultate einer Versuchsreihe mit, welche auf die früheren Beobachtungen von V. Lehmann zurückgreift. Bei einigen dieser Experimente führte ich jedoch eine Modifikation ein: ich begnügte mich nicht mit denjenigen Mengen der Alloxurbasen, welche in den Nucleinstoffen der Hefe enthalten sind, sondern fügte dieselben in freiem Zustande hinzu. Da diese Basen, wie die Untersuchungen von A. Kossel ergeben haben, in der Nucleinsäure nicht salzartig,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 59.

²⁾ l. c.

sondern organisch gebunden sind, so ist es möglich, daß die freien Nucleinbasen ein anderes Verhalten gegenüber der fermentativen Wirkung zeigen, wie die in der Nucleinsäure enthaltenen. Die Bestimmung der Basen wurde nach dem in Hoppe-Seyler-Thierfelders Handbuch der Analyse, 7. Auflage, S. 573 angegebenen Verfahren ausgeführt. Ich möchte ausdrücklich hervorheben, daß ich vor der Fällung der Basen mit ammoniakalischer Silberlösung eine Zersetzung der in der Lösung etwa vorhandenen Nucleinsäure durch Kochen mit Schwefelsäure bewirkte. Versäumt man diese Maßregel, so wird man Unregelmäßigkeiten der Analysenzahlen erhalten, denn nach A. Kossel ist die Gegenwart der Nucleinsäure imstande, die Fällung eines Teils der Basen durch ammoniakalische Silberlösung zu verhindern.¹⁾

Die Ergebnisse meiner Versuche waren im wesentlichen folgende:

1. Das Xanthin nahm stets bei der Digestion zu.
2. Das Guanin wurde bei der Autolyse zersetzt, auch wenn es in freiem Zustande hinzugefügt wurde.
3. Das Verhalten des Adenins und des Hypoxanthins war in den verschiedenen Versuchen ein verschiedenes. In einzelnen Fällen beobachtete ich eine Zunahme, in anderen eine Abnahme desjenigen Niederschlages, welcher diese Basen enthalten sollte. Da die Zunahme des Adenins eine völlig unerwartete und schwer verständliche Erscheinung ist, will ich einen Versuch dieser Art ausführlicher mitteilen.²⁾

120 cem Hefepreßsaft wurden mit 90 cem Guaninlösung versetzt und die Flüssigkeit in zwei Teile geteilt. Die eine Hälfte (B) wurde durch Kochen vom Ferment befreit, die zweite (A) blieb ungekocht. Beide wurden unter Zusatz von Toluol 40 Stunden im Brutofen digeriert.

¹⁾ F. du Bois-Reymonds Archiv für Physiologie 1893, S. 164, Anm. cf. A. Kossel und A. Neumann, Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 74.

²⁾ Die Publikation meiner übrigen Versuchszahlen behalte ich mir für eine spätere ausführliche Mitteilung vor, welche ich nach Vollendung weiterer Arbeiten über diese Frage zu machen gedenke.

Tabelle I.

	Stickstoff in Gramm		Basen in Gramm	
	Zusatz von 0,074 g Stickstoff in Form von Guanin		Zusatz von 0,185 g Guanin	
	A	B (Kontrolle)	A	B (Kontrolle)
Guanin	0,002	0,065	0,004	0,140
Adenin	0,060	0,002	0,116	0,038
Xanthin	0,020	0,011	0,054	0,030
Hypoxanthin	0,003	0,004	0,073	0,097
Gesamtstickstoff	0,085	0,082		

II. Über das Vorkommen von Arginase in der Hefe.

Durch die Untersuchungen von A. Kossel und H. D. Dakin wurde festgestellt, daß die tierischen Organe ein Ferment enthalten, welches Arginin in Harnstoff und Ornithin zerlegt.¹⁾ An diese Beobachtungen knüpft sich die Frage, ob die fermentative Zerlegung des Arginins durch Arginase zu den im Organismenreiche allgemein verbreiteten chemischen Erscheinungen gehört.

Die folgenden Beobachtungen zeigen, daß dieses Ferment auch bei Sproßpilzen zu finden ist.

Ich benützte zu diesen Versuchen, wie vorher, den Hefepreßsaft, 150 ccm desselben wurden in drei gleiche Teile geteilt. Zwei dieser Teile wurden mit 20 ccm einer Argininlösung versetzt, die dritte blieb ohne Zusatz. Alle drei wurden unter Zusatz von Toluol 4 Tage im Brutschrank digeriert. Die Untersuchung wurde ebenso ausgeführt wie bei den früheren Arbeiten von A. Kossel und H. D. Dakin, d. h. das Arginin wurde durch Silbersulfat und Baryt ausgefällt und die Menge desselben aus dem Stickstoffgehalt dieses Niederschlages berechnet, das Ornithin wurde aus dem Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure fällbaren, durch Silber und Baryt nicht fällbaren Sub-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 321, Bd. XLII, S. 181.

stanzen berechnet, der Harnstoff aus dem Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlags. Selbstverständlich handelt es sich hier wie bei den früheren Versuchen von A. Kossel und H. D. Dakin nicht um eine wirkliche Bestimmung des Ornithins und des Harnstoffs, sondern nur um den Nachweis, daß diejenige Fraktion, in welcher Ornithin und Harnstoff vorhanden sein muß, vermehrt ist oder nicht. Hierauf haben A. Kossel und H. D. Dakin bereits ausdrücklich hingewiesen.¹⁾ Auch ist eine genaue Bestimmung des Harnstoffs nach diesem Verfahren unsoweniger zu erwarten, da Kutscher und Otori neuerdings nachgewiesen haben, daß ein gewisser Teil des Harnstoffs in dem Silberbarytniederschlag zurückgehalten werden kann.²⁾

Dies Ergebnis meiner Versuche ist aus folgender Tabelle zu ersehen.

Tabelle II.

A. Stickstoffmengen in Gramm.

	A	B	C
Zugesetzt: Argminstickstoff	0.138	0.138	0
Gefunden: Argminstickstoff	0.081	0.088	0.053
Gefunden: Ornithinstickstoff	0.038	0.053	0.026
Gefunden: Stickstoff im Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlags	0.279	0.259	0.237
Gesamtstickstoff	0.442	0.448	0.298

B. Argininmengen in Gramm.

	A	B	C
Zugesetzt: Arginin in Gramm	0.428	0.428	0
Gefunden: Arginin in Gramm	0.252	0.273	0.165
Zersetzt: Arginin in Gramm	0.341	0.320	—

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 327.

²⁾ Zentralblatt für Physiologie, Bd. 18, Nr. 8 (1904).

Somit ist eine Abnahme des im Argininniederschläge enthaltenen Stickstoffs, hingegen eine Zunahme des «Ornithin- und Harnstoffstickstoffs» festgestellt worden. Die Hefe enthält somit wirksame Arginase.

Man könnte hiernach vermuten, daß auch das Guanidin, dessen Derivat das Arginin ist, durch die Arginase der Hefe zersetzt wurde. Dies ist jedoch nach meinen Versuchen nicht der Fall.

Zum Schlusse spreche ich Herrn Prof. A. Kossel für seine Anleitung bei diesen Arbeiten meinen aufrichtigsten Dank aus.