

Über die Synthese der phosphoorganischen Verbindungen in abgetöteten Hefezellen.

Von

Leonid Iwanoff.

(Aus dem botanischen Kabinett des Kaiserl. Forstinstitutes zu St. Petersburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. November 1906.)

In meiner Arbeit «Über Umwandlungen des Phosphors in der Pflanze usw.»¹⁾ konnte ich die Tatsache konstatieren, daß bei der Gärung der Preßhefe in reinem Zucker die anorganischen Phosphate derselben in organische Verbindung übergehen. Diese Tatsache im Zusammenhang mit der schon bekannten stimulierenden Wirkung der Phosphate auf die Gärung des Preßsaftes führte mich zum Gedanken, die Umsetzungen des Phosphors bei der Gärung abgetöteter Hefe ausführlicher zu untersuchen. Für meine weiteren Versuche diente mir ein Zymmin-Acetonpräparat von Schroder (München) und das neue Hefepräparat «Hefanol» derselben Firma.²⁾ Zur Bestimmung der anorganischen Phosphate benutzte ich fast in allen Fällen Titrierung mit Uranacetat, wie dies in Hoppe-Seyler's «Handbuch der physiologisch-chemischen Analyse» (7. Auflage, 1903, S. 423) angegeben ist. Die Uranacetatlösungen waren der großen Mengen der titrierten Phosphate wegen etwas konzentrierter zubereitet. Als Indikator diente Ferrocyankaliumlösung.

¹⁾ S. Travaux de la Société des Naturalistes de St. Pétersbourg. Vol. XXXIV, 1905.

²⁾ Aus dem Prospekt, den die Firma «Anton Schroder, Fabrik medizin. Hefe, München», «Hefanol» betreffend, publiziert, könnte man schließen, daß «Hefanol» eine trockene, aber lebendige Hefe vorstellt. Die mikroskopische Untersuchung und sein Verhalten gegen Anilinfarben und Antiseptica zeigen aber, daß «Hefanol» ähnlich dem Zymminpräparat ist.

Versuch I: Je 25 ccm 1%iger Dinatriumphosphatlösung wurden in Erlenmeyersche Kolben eingegossen und zu jeder Portion 2 g Zymin und verschiedene Mengen Rohrzucker zugefügt.

Nach eintägigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde zu jeder Portion 5 ccm Essigsäuremischung zugegossen, und der Niederschlag abfiltriert. 15 ccm des Filtrates oder die Hälfte des Kolbeninhaltes wurde mit Uranacetat titriert.

Es war beim Titrieren gefunden:

Tabelle I.

1 ccm Uranlösung = 0,006 g P_2O_5 .

	Ohne Zymin	Mit Zymin			
	Zucker 12% ccm	Zucker 4% ccm	Zucker 12% ccm	Zucker 20% ccm	Zucker 30% ccm
a)	5	0,8	0,7	0,7	0,8
b)	4,8	0,7	0,8	0,65	0,65

Die Tabelle zeigt, daß die mit Uranacetat reagierenden Phosphate bei der Gärung des Zymins stark abnehmen.¹⁾ Schon nach 24 Stunden geht beinahe 90% der gegebenen Phosphate in organische Verbindung über. Außerdem zeigt die Tabelle, daß die Konzentration des Zuckers auf die Umwandlung sowie auf die Gärung selbst²⁾ in weiten Grenzen ohne Wirkung bleibt.

In welcher Weise die Synthese von der Konzentration der Phosphate abhängt, zeigt der folgende zweite Versuch.

Versuch II: Wie der vorhergehende Versuch I, wurde auch dieser Versuch angestellt, nur die Kontrolle wurde etwas umgeändert. In die Kontrollkolben wurde, wie in alle übrigen, 2 g Zymin zugefügt und dann wurden sie am Anfang des Ver-

¹⁾ Dasselbe scheinen Harden und Joung, soviel ich nach dem Referat im Zentralbl. f. Bakter., II, Bd. XVII, Nr. 8/10, S. 251, urteilen kann, beobachtet zu haben.

²⁾ S. E. Buchner, Die Zymasegärung, 1903, S. 150, und besonders Richter, Comptes rendus des séances de la Soc. des Naturalistes de St. Pétersbourg, 1904.

suches auf siedendem Wasserbade $\frac{1}{4}$ Stunde erhitzt. Die Konzentration der Saccharose war gleich 4%; der Versuch dauerte 20 Stunden bei Zimmertemperatur.

Tabelle II.

Konzentration der Phosphate		0,5 %	1,2 %	2,5 %	5 %
Gekochte (Kontrolle)	a)	6,1 ccm	10,5 ccm	20 ccm	39,7 ccm
	b)	6,2 »	10,5 »	20 »	39,5 »
Ungekochte	a)	1,2 ccm	2,0 ccm	1,5 ccm	7,7 ccm
	b)	1,1 »	1,7 »	1,5 »	7,7 »
Die synthetisierte Menge P_2O_5 in mg		60	102	222	384
Die synthetisierte Menge P_2O_5 in Prozent der Anfangsmenge der Phosphate		83	85	92	90

Die Tabelle zeigt, daß die Synthese der Phosphatmenge beinahe proportional geht und in kurzer Zeit 83—90% der Anfangsmenge erreicht.

In den weiteren Versuchen zeigte es sich, daß die Synthese auch im Extrakt von gärendem Zymin oder Hefanol sehr heftig vor sich geht. Im Gegenteil zeigt der gleichzeitig bereitete Extrakt von nicht gärendem Zymin evtl. Hefanol keine Spur von der genannten Reaktion.

Versuch III. In demselben wurden: 5 g Zymin, 2,5 g Saccharose, 25 ccm Wasser und 0,5 ccm Toluol genommen. Nach 24stündiger Gärung bei $14^\circ C$. wurde die Flüssigkeit abfiltriert und zu 20 ccm des klaren gelblichen, opaleszierenden Filtrats 20 ccm 9%iger Na_2HPO_4 zugefügt. Nach 24stündigem Stehen bei $14^\circ C$. wurde das Gemisch mit gleichem Volumen Wasser verdünnt und 2 Proben von je 10 ccm zur Phosphatbestimmung genommen. Nach 48 Stunden wurde noch eine gleiche Probe genommen. Zur Kontrolle dienten 2 Proben von je 10 ccm Gemisch der gebrauchten Phosphatlösung in doppelter Verdünnung.

Tabelle III.

		Gebrauchtes Uranacetat	
		ccm	ccm
Kontrolle	a)	15	—
	b)	15	—
		nach 1 Tage	nach 2 Tagen
Filtrat	a)	7,8	5,6
	b)	7,0	—

Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, daß 50% der zum Filtrat zugefügten Phosphatmenge in organische Form umgewandelt wurde. Dieselbe Reaktion geht auch im Hefanol, wie der folgende Versuch zeigt.

Versuch IV. Es wurde genommen: 1. 2 g Hefanol, 2 g Saccharose, 25 ccm Wasser und 0,5 ccm Toluol; 2. 2 g Hefanol, 25 ccm Wasser und 0,5 ccm Toluol. Nach 20 Stunden wurden das gärende und nicht gärende Gemisch filtriert und zu 10 ccm eines jeden 10 ccm 9%iger Na_2HPO_4 -Lösung und je 0,4 ccm Toluol zugefügt.

Nach 24 Stunden gab die Titrierung von 10 ccm der beiden Flüssigkeiten folgendes:

	Verbrauchtes Uranacetat ccm
Filtrat ohne Gärung	16,4
Filtrat nach Gärung	3,0

Dieser Versuch zeigt auch, daß die Synthese sogar ohne Gärung nur bei Anwesenheit der Gärungsprodukte geht. Daß nicht Zucker selbst, sondern seine Zersetzungsprodukte die Rolle dabei spielen, zeigt folgender Versuch:

Versuch V. Es wurde genommen: 10 g Hefanol und 100 ccm Wasser. Nach 24stündigem Stehen bei 12° C. wurde die Flüssigkeit abfiltriert und das Filtrat auf solche Weise behandelt:

	10 ccm des Filtrates fordern folgende Mengen Uranacetats	
	nach 2 Tagen ccm	nach 6 Tagen ccm
1. 10 ccm Filtrat, 10 ccm 9 ^o /oiger Na ₂ HPO ₄ -Lösung, 2 g Saccharose, 0,4 ccm Toluol	15,8	16,0
2. 10 ccm Filtrat, 10 ccm 9 ^o /oiger Na ₂ HPO ₄ -Lösung, 0,4 ccm Toluol	16,0	—
3. 10 ccm Filtrat, 10 ccm Wasser, 0,4 ccm Toluol	1,8	2,0

Folglich findet keine Synthese statt, wenn die Zersetzungsprodukte des Zuckers, die bei alkoholischer Gärung gebildet werden, fehlen.

Die Natur der fraglichen Verbindung, die aus Phosphorsäure und Zuckerzersetzungsprodukten synthetisiert wird, betreffend, kann ich nur folgende bis jetzt erhaltene Resultate mitteilen. Zur Ausscheidung der synthetisierten phosphoorganischen Verbindung benutzte ich die Methode, die Posternak¹⁾ zur Ausscheidung von Inositphosphorsäure beschrieben hat. Ich führte das auf folgende Weise aus; ich nahm: 50 g Saccharose, 10 g Na₂HPO₄ + 12 H₂O, 40 g Zymin, 1 l Wasser.

Nach 1 tägigem Stehen bei Zimmertemperatur verbrauchten 10 ccm dieses Gemisches nur 2,3 ccm Uranacetat. Nach 4 Tagen gab die Probe von 10 ccm schon beim Zusatz von 0,2 ccm Uranacetat die rote Färbung mit Ferrocyankaliumlösung. Mit Magnesiummischung gab die Probe statt der sehr charakteristischen Kristalle von Ammoniummagnesiumphosphat einen schwerfallenden Niederschlag, der unter dem Mikroskop als unregelmäßig abgerundete Körnchen erschien.

Es zeigte sich also, daß der anorganische Phosphor nur in Spuren zurückgeblieben war und die ganze Menge desselben in organische Verbindung synthetisiert wurde.

Dann wurde die Flüssigkeit abfiltriert und zum Filtrat eine gesättigte Lösung von Kupferacetat im Überschuß zugefügt. Es

¹⁾ S. Comptes rendus, Vol. 137, 1903, p. 202 und Patten and Hart, Bulletin Nr. 250, New-York Agricultural Experim. Station 1904.

fiel dabei ein bläulicher, voluminöser Niederschlag, der beim Kochen mit Molybdänmischung eine Reaktion auf Phosphorsäure zeigte.

Das Filtrat vom ersten Kupferniederschlag gab beim Erhitzen noch einen Niederschlag, der beim Erkalten sich wieder auflösen kann. Das Filtrat von dieser beim Erhitzen ausgeschiedenen Kupferverbindung zeigte nur noch geringe Spuren der Phosphorsäurereaktion beim Kochen mit Molybdänmischung.

Also geht beinahe die ganze Menge der organischen Phosphorsäure bei einer solchen Fällungsmethode in den Niederschlag über.

Der so erhaltene Kupferniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und dann vom Kupfersulfid durch Filtration und von Schwefelwasserstoff durch Lufteinleiten befreit. Auf solche Weise erhielt ich eine Flüssigkeit von gelblicher Farbe, süßlichem Geruch und saurem Geschmack. Sie war spezifisch schwerer als Wasser und gab fast keinen Niederschlag mit Ätheralkoholgemisch. Eine mehr oder minder leichte, dabei entstandene Trübung scheint von Albumosen zu stammen, die dem Kupferniederschlag beigemennt waren. Die Flüssigkeit ist optisch inaktiv, beim Erhitzen wird sie gelblichbraun und beim Abdampfen auf heißem Wasserbade geht sie in eine schwarze harzige Masse über. Die in diesem Zustande analysierte Verbindung zeigte nur Spuren von N und 14,4% P.

Beim Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure wandelt sich die Flüssigkeit in eine dicke sirupöse Masse um, die bei Luftzutritt allmählich erst eine gelblich-grüne, nachher eine dunkelbraune Farbe annimmt. Die Flüssigkeit reduziert etwas Fehlinglösung und Kupferacetat schon in der Kälte. Beim Erhitzen geht die Reduktion sehr schnell vor sich.

Beim Erwärmen auf dem Wasserbade mit Phenylhydrazin in essigsauerer Lösung und beim nachherigen Abkühlen scheiden kleine Büschel gelber Nadelchen aus, die bei 140—142° unter Braunfärbung schmelzen. Sie lösen sich leicht in heißem Wasser und Alkohol und die Lösungen sind optisch inaktiv.

Alle diese Reaktionen zeigen, daß die Phosphor-

säure in eine Aldo- oder Ketogruppen enthaltende Verbindung eintritt.

Die Reaktion von Molisch mit α -Naphtol und Schwefelsäure gibt die für Kohlehydrate charakteristische violette Färbung mit Phloroglucin, sowie mit Resorcin und HCl eine rote bis braunrote Färbung. Hieraus kann man schließen, daß der fragliche Komponent eine einfachere Aldose oder Ketose sein kann.

Als ich die Bedingungen der Synthesereaktion und Ausscheidung variierte, konnte ich das Produkt mit denselben allgemeinen Eigenschaften erhalten.

Wenn die Synthese nicht bis zum vollständigen Verschwinden der anorganischen Phosphate ging, fällte ich diese mit Magnesiamischung und erst danach behandelte ich das Filtrat mit Kupferacetat. Diese Operation war ohne merklichen Einfluß auf das nachher erhaltene Produkt. Dasselbe kann man von der Operation sagen, die die Entfernung von Albumosen Spuren erleichtert.

Nach der ersten Ausscheidung mittels Kupferacetat und H_2S wurde die erhaltene Flüssigkeit durch Sodazusatz alkalisch gemacht und mit $BaCl_2$ gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und dann mit H_2SO_4 zersetzt. Die so nach der Filtration erhaltene Flüssigkeit gab mit Ätheralkoholgemisch nur geringfügige Trübung.

Wenn ich weiterhin das Filtrat nach der Fällung in der Kälte mit Kupferacetat auf dem Wasserbade erwärmte, erhielt ich noch einen Niederschlag, der nachher bei weiterer Behandlung das Produkt mit 19% P gab.

Endlich, wenn die Synthese nicht in Saccharose, sondern in Glukose- oder Lävuloselösung vor sich ging, dann erhielt ich das Produkt mit verschiedenem Phosphorgehalt:

in Glukose 19,6 — 20% und

in Lävulose 13,4 — 14,4%.

Das Glukoseprodukt gab mit Phenylhydrazin dieselben gelben Nadeln (Schmelzpunkt 142°), das Lävuloseprodukt aber die glänzenden blaßgelben Blätter, die ohne Zersetzung und Braunfärbung bei 125° schmelzen.

Nach den Eigenschaften der Phenylhydrazinverbindungen zu urteilen, müßte man voraussetzen, daß die Phosphorsäure sich mit einer Triose (Glycerose oder Dioxyaceton) oder mit aus dieser entstehendem Methylglyoxal verbindet.

Wie weit diese Unterschiede im Zusammenhang mit vergorenen Zuckerarten stehen, können nur weitere ausführliche Untersuchungen entscheiden.

Die Beständigkeit der Verbindung gegen die Zersetzung ist ziemlich groß. Beim Stehen während einer halben Stunde mit 5%iger Schwefelsäure auf dem Wasserbade kann man die Zersetzung kaum bemerken. Mit HNO_3 und NaHO im Gegenteil geht die Zersetzung sehr rasch. Die Essigsäure erzeugt keine Zersetzung sogar bei sehr langem Erhitzen. Dieser Umstand läßt die Bestimmung der anorganischen Phosphate durch Titration mit Uranacetat als beste Methode für diese Zwecke erkennen.

Bei dreimonatlicher Aufbewahrung in wässriger Lösung wird nur dann die Zersetzung bemerkbar, wenn ein Pilzmycel erscheint. Jedenfalls muß man bemerken, daß die Kulturen von *Penicillium* auf dieser synthetisierten Verbindung ohne andere organische Nahrungsquellen sehr schlecht gelingen.

Weitere Untersuchungen über die Synthesereaktion, ihre Produkte und ihren physiologischen Wert werden fortgesetzt.

