

Über Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe.

II. Mitteilung.¹⁾

Von

E. Salkowski.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 7. Januar 1908.)

Vor nunmehr etwa 18 Jahren habe ich gefunden, daß bei der Autodigestion — oder wie man jetzt in der Regel sagt, Autolyse — der Bierhefe in Chloroformwasser (verwendet wurde hauptsächlich Preßhefe) ein gärungsfähiger Zucker entsteht und zwar, wie von vornherein anzunehmen war, aus den präformierten Kohlenhydraten der Hefe. Die nicht weiter, außer etwa durch Fällung mit Bleiessig oder durch Fällung mit Alkohol nach dem Einengen gereinigten Filtrate der autolysierten Hefe erwiesen sich regelmäßig linksdrehend. Da man bei der Hydrolyse der Kohlenhydrate der Hefe durch Säuren rechtsdrehende Zuckerarten erhält — aus dem Hefegummi d-Mannose,²⁾ aus der Hefecellulose bezw. Glykogen d-Glukose³⁾ —, so war es gewiß von vornherein sehr wahrscheinlich, daß auch durch Fermentwirkung rechtsdrehender Zucker entsteht, die stets beobachtete Linksdrehung mithin sehr auffallend. Trotzdem sah ich mich veranlaßt, den bei der Autolyse entstehenden Zucker, wenn auch mit einer gewissen Reserve, als linksdrehenden zu bezeichnen, da damals von linksdrehenden, bei der Autolyse entstehenden Körpern — abgesehen von dem immer nur in kleinen Mengen vorhandenem Pepton — nichts Sicheres bekannt war. Ich bemerkte damals noch, daß ich auf die Natur des Zuckers nicht

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 506 (1889).

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 501 (1894). — Dieselbe Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 315. — Hessenland, Zeitschrift des Vereins für Rübenzuckerindustrie, Bd. XLII, S. 671.

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 3327 (1894).

näher eingehen könne, weil es mir an den nötigen Hilfsmitteln zur Verarbeitung größerer Mengen von Autolysenflüssigkeit mangle.

Inzwischen hat sich die Sachlage ganz wesentlich geändert. Wir wissen jetzt, daß das durch Fermentwirkungen aus dem Eiweiß abgespaltene Leucin (α -Aminoisobutylelessigsäure) in der Regel linksdrehendes ist. Damit ist die Linksdrehung der nur durch Bleiessigfällung oder Alkoholfällung gereinigten Autolysenflüssigkeit aus Hefe ausreichend erklärt. Daß die Linksdrehung dieser reichlich Leucin enthaltenden Filtrate in der Tat von dem Gehalt an Leucin abhängt, läßt sich leicht dadurch zeigen, daß man sie mit Salzsäure ansäuert (schon $\frac{1}{10}$ Vol. 25%iger Salzsäure genügt): die Drehung wird dann sofort rechts und zwar stärker rechts, als sie vorher links war. Die stärkere Rechtsdrehung kann darauf beruhen, daß das von J. Ehrlich¹⁾ entdeckte Isoleucin in wässriger Lösung zwar rechts dreht, aber nur verhältnismäßig schwach ($\alpha_D = -9,74^\circ$), in salzsaurer Lösung dagegen stark ($\alpha_D = +36,8^\circ$).

Allerdings habe ich²⁾ mich selbst einmal dagegen ausgesprochen, daß die Linksdrehung solcher Lösungen vom Leucin abhängen könne, allein das damals zur Begründung dieser Ansicht benutzte Leucinpräparat war augenscheinlich in erheblichem Grade racemisiert, denn es zeigte nur eine spezifische Drehung von etwa $-1,8^\circ$ (in weißem Licht).

Weiterhin ist inzwischen die Reaktion von Seliwanoff bekannt geworden, welche es ermöglicht, sich jederzeit davon zu überzeugen, daß in der Autolysenflüssigkeit der Hefe keine Fruktose vorhanden ist. Wenn nun die Gegenwart von d-Glukose auch kaum zweifelhaft sein konnte, so war es trotzdem wünschenswert, dieselbe direkt nachzuweisen. Hierzu benutzte ich zunächst das bewährte Verfahren der Fällung mit Bleiessig + Ammoniak.

1 kg amyllumfreie (resp. fast amyllumfreie) Preßhefe wurde mit 8 l Chloroformwasser unter Zugabe von etwas überschüssigem

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1809 (1905).

²⁾ Zeitschrift f. Biolog., Bd. XXXII, S. 468 (1895).

Chloroform 68 Stunden bei 40° digeriert, dann ohne nachzuwaschen filtriert. Das fast ganz klare Filtrat wurde im Vakuumapparat auf etwa ein Drittel eingedampft. Obwohl die Temperatur der Flüssigkeit dabei nie über 35° stieg, trat dabei doch starke Bräunung ein. Die neutral reagierende Flüssigkeit wurde mit Bleiessig gefällt,¹⁾ das Filtrat davon mit Bleiessig + Ammoniak, der Niederschlag abgenutscht und zweimal mit Wasser gewaschen, dann zu einem dünnen Brei angerührt und durch einen CO_2 -Strom zersetzt.²⁾ Da das Filtrat sich etwas bleihaltig erwies, wurde es mit H_2S behandelt, vom PbS abfiltriert und der überschüssige H_2S wieder durch einen CO_2 -Strom entfernt. Nachwaschen wurde ebenso wie im folgenden unterlassen, um die Konzentration der Lösungen möglichst wenig zu beeinträchtigen.

Ich hatte nun keineswegs erwartet, daß die so erhaltene Lösung eine einigermaßen reine Zuckerlösung sein würde, war aber doch von der Anzahl und Quantität der in ihr außer Zucker noch enthaltenen Verbindungen überrascht. Es waren in ihr außer gärungsfähigem Zucker noch nachzuweisen: Hefegummi, ein dextrinartiger Körper, Pentosen, Purinbasen, Tyrosin, Lysin.³⁾ Spuren von Leucin und Pepton, ferner, wenigstens in 2 darauf untersuchten Fällen, Bernsteinsäure, und zwar in nicht ganz unbedeutlicher Quantität. Ich gehe nicht näher auf die Einzelheiten des Nachweises aller dieser Verbindungen ein, da sie, d. h. die Einzelheiten, ohne allgemeines Interesse sind.

Bemerkenswert ist jedenfalls das Auftreten von Bernsteinsäure trotz der Sättigung der Autodigestionsflüssigkeit mit Chloroform und trotz sicheren Fehlens von Bakterienentwicklung. Da nach E. Buchner und Meisenheimer⁴⁾ die zellfreie Gärung keine Bernsteinsäure liefert, bleibt zur Erklärung ihres Auf-

¹⁾ Dieser Niederschlag enthält nur Spuren von Zucker nach der Zersetzung mit CO_2 oder H_2S .

²⁾ Die Zersetzung auf CO_2 ist, wie die nachträgliche Behandlung mit H_2S zeigte, in bezug auf die Zuckerbleiverbindung so gut wie vollständig.

³⁾ Kutscher hat dasselbe in großen Mengen bei der Selbstgärung der Hefe erhalten. Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 72 (1901).

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIX, S. 3201 (1906).

treten im vorliegenden Falle eigentlich nur noch die Möglichkeit der Entstehung aus Eiweiß durch autolytische Vorgänge: es liegt nahe, dabei an die Entstehung aus Arginin durch Oxydation, entsprechend den Angaben von Kutscher,¹⁾ zu denken. Übrigens ist, wie ich schon früher bemerkt habe, eine geringe Vergärung des Zuckers im Beginn des Versuches nicht zu vermeiden, in wie weit bei dieser autolytische Vorgänge an der Bildung der Bernsteinsäure beteiligt sind, muß dahingestellt bleiben.

Die aus dem Bleiessig-Ammoniakniederschlag auf dem angegebenen Wege erhaltene, mit Kohle entfärbte Lösung erwies sich rechtsdrehend, jedoch hat die Rechtsdrehung bei der komplizierten Zusammensetzung natürlich keinerlei Beweiskraft.

Zur Reinigung wurde die Lösung zunächst mit Quecksilber(oxyd)acetat gefällt, filtriert, aus dem Filtrat das überschüssige Quecksilber durch H_2S entfernt, das Filtrat durch einen CO_2 -Strom von H_2S befreit. Der Erfolg war wenig befriedigend: die Lösung war noch erheblich stickstoffhaltig und enthielt auch noch die störenden Kohlenhydrate, wenn auch vielleicht nicht in der früheren Menge. Beim Einengen schied sich wiederholt Tyrosin ab, durch Fällungen mit Alkohol ließen sich die Kohlenhydrate nur zum Teil entfernen. Die Ausfällung des Hefegummis gelang allerdings vollständig, aus dem aufs neue eingedampften Alkoholauszug schied sich aber bei erneutem Alkoholzusatz eine dextrinartige Substanz aus, welche nicht mehr die für Gummi charakteristische Reaktion mit Fehling'scher Lösung (bläulich-weiße Fällung) gab. Diese Niederschläge erwiesen sich nun aber in wässriger Lösung stark reduzierend und die Quantität des Zuckers nahm bei den fortgesetzten Fällungen fortdauernd ab. Es muß dahingestellt bleiben, ob dieses Dextrin an sich reduzierend wirkt oder nur infolge der Beimischung von Zucker; ich halte das letztere bei der bekannten Schwierigkeit, Dextrin und Traubenzucker durch Alkoholbehandlung zu trennen, für wahrscheinlicher. Aus 1 kg Hefe erhielt ich so nur 100 ccm einer einigermaßen reinen Lösung von 0,7% Rechtsdrehung. Es gelang nicht, aus solchen eingedampften Lösungen aus mehreren Kilo Hefe eine Krystallisation von

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 418 (1901).

Traubenzucker zu erhalten, auch nicht eine solche der Chlor-natriumverbindung.

Zur Identifizierung des Zuckers als d-Glukose blieb nun kaum noch etwas anderes übrig, als die Darstellung der von Stahel¹⁾ beschriebenen Diphenylhydrazonverbindung. Im Hinblick auf das unbefriedigende Ergebnis der Bleiessig-Ammoniakfällung wurde bei dem Versuch der Darstellung dieser Verbindung von dem Bleiessig-Ammoniakverfahren zunächst abgesehen.

Die aus 1 kg Hefe stammende filtrierte Autolysenflüssigkeit wurde zuerst im Vakuum auf etwa 1 l eingeengt, dann mit dem mehrfachen Volumen 95%igen Alkohols versetzt, das alkoholische Filtrat verdunstet und aufs neue mit Alkohol gefällt, das Filtrat bis fast zum dünnen Sirup verdunstet, mit einer Lösung von Mercurisulfat in 5%iger Schwefelsäure gefällt und zu dem Gemisch soviel Alkohol hinzugefügt, daß kein merklicher Niederschlag mehr entstand. Die dicke gelbliche Fällung wurde nach 48 Stunden abgesaugt und mit 50%igem Alkohol nachgewaschen. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbad von der Hauptmenge des Alkohols befreit, dann durch Behandlung mit gesättigtem Barytwasser, Baryumcarbonat und H_2S vom Quecksilber und Schwefelsäure befreit. Die nach dem Filtrieren erhaltene wasserklare, schwach sauer reagierende Lösung wurde nunmehr zuerst auf etwa 250 ccm konzentriert, sie reduzierte Fehlingsche Lösung beim Erhitzen intensiv unter Ausscheidung von Kupferoxydul und gab deutliche Pentosereaktion mit Orcin + Salzsäure.

Zur Darstellung der Verbindung mit Diphenylhydrazon wurde nun die Lösung bis auf etwa 50 ccm konzentriert, dann ca. $4\frac{1}{2}$ g Diphenylhydrazin gelöst in 50 ccm Alkohol hinzugefügt und die Mischung auf dem Wasserbad zum Sirup verdunstet; am zweitnächsten Tag war dieser zu einem violett-schwarzen Krystallbrei erstarrt. Derselbe wurde mit einem Gemisch von Äther mit wenig Alkohol so lange gewaschen, bis er nur noch schwach gelblich war.

Der krümelige Rückstand bestand hauptsächlich aus dem gesuchten Diphenylhydrazon. Es wurde aus heißem Wasser

¹⁾ Beilstein, Handbuch, 3. Aufl., Bd. IV, S. 791.

unter Zusatz von Knochenkohle umkrystallisiert, dann, da es noch etwas gelblich war, nochmals in heißem Alkohol gelöst und durch Ätherzusatz abgeschieden und erschien nunmehr krystallinisch und völlig weiß.

Das so erhaltene Hydrazon schmolz bei 160—161° und stimmte in seinen Eigenschaften und Löslichkeitsverhältnissen für Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol mit den Angaben von Stahel für das d-Glukose-Diphenylhydrazon $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{—CH—NN}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ überein.

0,1758 gaben 12,7 ccm N bei 21° und 761 mm B.

Somit N	Gefunden:	Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_2$:
	8,31%	8,09%

Damit ist die d-Glukose nachgewiesen und ich muß meine alte, allerdings nur mit Reserve gemachte Angabe, an der ich selbst schon lange Zweifel hegte, daß die Hefeautolyse linksdrehenden Zucker liefere, berichtigen.

In einem anderen Falle wurde der Zucker zuerst mit Bleiessig + Ammoniak ausgefällt, die Lösung dann mit Mercuriacetat gefällt usw. Das Resultat war jedoch weniger befriedigend: es gelang nur schwierig, die Diphenylhydrazonverbindung krystallisiert zu erhalten, und die Ausbeute war weit geringer. Der Schmelzpunkt lag zwischen 158 und 159°.

Es fragt sich nun weiterhin, ob und inwieweit durch die inzwischen gemachten Beobachtungen meine Angaben über die in den einzelnen Versuchen übrigens sehr schwankende Quantität des bei der Autolyse der Hefe entstehenden Zuckers beeinflußt werden.

In meiner damaligen Arbeit habe ich die Bestimmungen einfach so ausgeführt, daß ich eine abgemessene Quantität des Autolysenfiltrates nach Entfernung des Chloroforms mit Fehlingscher Lösung erhitzte: das ausgeschiedene Cu_2O wurde nach Überführung in CuO gewogen. Kann diese Art der Bestimmung noch als korrekt angesehen werden? Es kommen dabei, soweit ich sehe, 3 Punkte in Betracht.

1. Drechsel¹⁾ hat beobachtet, daß beim Erhitzen einer Traubenzucker enthaltenden alkalischen Lösung von Xanthin,

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXV, S. 2454 (1892).

Hypoxanthin und Guanin mit Fehlingscher Lösung sich nicht Kupferoxydul, sondern die Kupferoxydulverbindungen der Xanthin(Purin-)basen ausscheiden. Hammarsten¹⁾ hat das Gleiche für die Pentose des Pankreasnucleoproteids festgestellt. Dasselbe berichten Neuberg und Brahn²⁾ in ihrer Arbeit über die Inosinsäure. Maßgebend für die Beschaffenheit des Niederschlages ist natürlich die Relation zwischen Zucker und Hypoxanthin, d. h. je nach der Quantität der Glukose oder Pentose im Verhältnis zu der Purinbase, z. B. Hypoxanthin, wird entweder nur weißes Hypoxanthinkupferoxydul oder daneben auch Kupferoxydul gebildet, und es erklärt sich so die wechselnde Färbung der Niederschläge. Die Autolyseflüssigkeit enthielt nun stets Hypoxanthin (daneben noch andere Purinbasen), dem Kupferoxydul muß also bei Ausführung der Zuckerbestimmung mit Fehlingscher Lösung stets die Hypoxanthinverbindung beigemischt gewesen sein: da ich aber den Niederschlag nicht direkt gewogen habe, sondern nach dem Glühen und Überführen in Kupferoxyd, so kann dieser Umstand nicht von Bedeutung gewesen sein.

2. Die Autolyseflüssigkeit enthält stets Gummi, es muß sich also beim Erhitzen mit Fehlingscher Lösung die Gummikupferverbindung ausscheiden und zu einem fälschlichen Plus von Kupferoxyd führen. Dieses Verhalten ist mir damals nicht entgangen. Es heißt l. c. S. 510: Die Reinheit der Reaktion wird ferner öfters getrübt durch die Gegenwart von Hefegummi in den Lösungen. Es scheidet sich alsdann nach Zusatz von Fehlingscher Lösung eine beim Erwärmen zunehmende feinflockige weißliche Trübung aus, welche beim stärkeren Erhitzen gelb wird, indem sich das Kupferoxydul auf den gummihaltigen Flocken niederschlägt.

Indessen habe ich diesen Umstand nur für den qualitativen Nachweis erwähnt, seinen zweifellos vorhandenen Einfluß auf die quantitative Bestimmung dagegen nicht berücksichtigt. Ob der dadurch verursachte Fehler erheblich ist oder überhaupt irgendwie in Betracht kommt, läßt sich vorläufig

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIX, S. 21 (1894).

²⁾ Bioch. Zeitschrift, Bd. V, S. 417 (1907).

nicht sagen, ich gedenke darauf in einer folgenden Abhandlung über die Muttersubstanz der d-Glukose zurückzukommen. Ist nun aber überhaupt in der Autolyselüssigkeit stets Gummi vorhanden? In meiner damaligen Arbeit heißt es nur öfters, nach vielen inzwischen gemachten Beobachtungen möchte ich indessen annehmen, daß in der Tat stets Gummi in der Lösung vorhanden ist, seine Quantität mag wechseln.

3. Ohne Zweifel von Einfluß ist die Pentose, die damals nicht vermutet werden konnte. Da indessen ihre Menge gering ist, so wird sie auch die Zuckerbestimmung wenig beeinflußt haben.

Alles in allem ist es wohl nicht zweifelhaft, daß die Zuckerbestimmungen etwas zu hoch ausgefallen sind, ich glaube indessen annehmen zu können, daß der Fehler nicht erheblich gewesen ist. Dafür spricht ein Versuch, in dem der Zucker nicht nur nach Fehling, sondern gleichzeitig auch durch Vergärung bestimmt wurde (l. c. S. 514). Die erhaltenen Werte liegen sehr nahe aneinander.

Einen völlig einwandfreien Weg zur quantitativen Bestimmung der d-Glukose in der kompliziert zusammengesetzten Flüssigkeit zu finden, ist mir bisher nicht gelungen. Die Reduktionsmethoden entsprechen den Anforderungen nicht wegen der Gegenwart der Pentosen, aber auch das Gärungsverfahren ist vielleicht nicht ganz einwandfrei, da kleine Mengen von Pentose mit gärungsfähigem Zucker mit zu vergären scheinen, ein Verfahren aber, die Pentosen vor Anstellung des Versuches abzuscheiden oder die Glukose quantitativ von Pentosen zu trennen, sich schwerlich finden lassen wird.