

Über die Kohlehydrate der Hefe.

Von

W. Meigen und A. Spreng.

(Der Redaktion zugegangen am 23. Januar 1908.)

In den letzten fünfzig Jahren ist die Hefe wiederholt Gegenstand chemischer Untersuchungen gewesen. Trotzdem «ist über die chemische Zusammensetzung der Zellmembran der Hefe bisher noch keine klare Auffassung erzielt worden.»¹⁾ Das einzige, was die bisherigen Arbeiten mit ziemlicher Sicherheit ergeben haben, ist, daß die Hefezellwand weder aus der bei den höheren Pflanzen allgemein verbreiteten echten Cellulose, noch aus dem bei Pilzen häufig vorkommenden Chitin besteht. Es war gelungen, die Zellwand in zwei kohlehydratähnliche Bestandteile zu zerlegen, die sich durch ihre verschiedene Löslichkeit von einander unterscheiden, indem sich der eine, das «Hefegummi», bereits in heißem Wasser löst, während der andere, die «Hefecellulose», darin nicht löslich ist. Im einzelnen gehen aber die Angaben über die Natur und das Verhalten dieser beiden Kohlehydrate weit auseinander. Durch unsere nachstehend mitgeteilten Untersuchungen haben wir versucht diese Widersprüche aufzuklären und einige der noch strittigen Fragen ihrer Beantwortung entgegenzuführen.

Die von uns benutzte Hefe war teils frische Bierhefe, die wir von der Ganterschen Brauereigesellschaft in Freiburg i. Br. erhielten, teils eine Hefe, die zur Gewinnung von Cerolin durch Ausziehen mit Alkohol und Äther bereits von Fett befreit war, und die uns von der Chemischen Fabrik Böhringer und Söhne in Waldhof bei Mannheim zur Verfügung gestellt wurde. Beiden Firmen sprechen wir auch an dieser

¹⁾ Czapek, Biochemie der Pflanzen, Jena 1905, Bd. I, S. 508.

Stelle unseren besten Dank aus für das bereitwillige Überlassen der zu unseren Untersuchungen erforderlichen Hefemengen.

I. Das Hefegummi.

Durch wiederholtes Auskochen von Hefe mit Wasser erhielt Schützenberger¹⁾ eine gummiartige, durch Alkohol aus der wässerigen Lösung fällbare Substanz, die er für identisch mit dem arabischen Gummi ansah. Als Elementarzusammensetzung fand er C 42,7^o/_o, H 6,4^o/_o. Diese Zahlen stimmen ziemlich gut auf die Formel C₁₂H₂₂O₁₁, für welche die Theorie C 42,1^o/_o, H 6,5^o/_o verlangt. Bei der Hydrolyse des Gummis mit Schwefelsäure erhielt er einen Sirup, der Fehling'sche Lösung reduzierte. Die Oxydation des Sirups mit Salpetersäure lieferte ihm Schleimsäure und Oxalsäure. Dies würde für Galactose als Hauptbestandteil des Sirups sprechen. Das Hefegummi konnte demnach nicht mit dem arabischen Gummi übereinstimmen, da dieses bei der Hydrolyse in Arabinose übergeht.

Béchamp,²⁾ der fast gleichzeitig mit Schützenberger das Hefegummi auf dieselbe Weise darstellte, wies auch diese Annahme zurück und konnte ihre Unrichtigkeit durch Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens beweisen. Er fand für Hefegummi $\alpha_D = +59^\circ$ bis $+61^\circ$, während arabisches Gummi linksdrehend ist ($\alpha_D = -24^\circ$). Auch Béchamp oxydierte den bei der Hydrolyse des Gummis erhaltenen Sirup mit Salpetersäure und erhielt hierbei ebenfalls Schleimsäure.

Zu ganz anderen Ergebnissen kamen Nägeli und Loew,³⁾ die ihren «Pilzschleim aus Hefe» in der gleichen Weise durch mehrmaliges Auskochen der Hefe mit Wasser gewannen. Für das spezifische Drehungsvermögen fanden sie $\alpha_D = +78^\circ$; die Elementaranalyse ergab C 41,43^o/_o, H 6,60^o/_o. Die Oxydation des durch Hydrolyse dargestellten Sirups ergab ihnen Zuckersäure; es war also in dem Sirup nicht Galactose, sondern Dextrose vorhanden. Im übrigen zeigte ihr Pilzschleim das

¹⁾ Bull. de la Soc. chim. de Paris, 2^e sér., Bd. XXI, S. 204 (1874) und Compt. rend., Bd. LXXVIII, S. 493 u. 698 (1874).

²⁾ Compt. rend., Bd. LXXVIII, S. 645 (1874).

³⁾ Liebigs Annalen, Bd. CXCIII, S. 322 (1878).

gleiche Verhalten wie die von Schützenberger und Béchamp dargestellten Gummipräparate; er war fällbar durch Alkohol, alkalische Bleiessiglösung, Fehlingsche Lösung und Barytwasser. Mit Phenylhydrazin lieferte er kein Hydrazon oder Osazon, mit Hydroxylamin kein Oxim. Fehlingsche Lösung wurde nicht reduziert. Nägeli und Loew waren der Ansicht, daß das Gummi aus der Zellwand stamme, und daß durch genügend langes Kochen die ganze Zellwand in diesen «Pilzschleim» überführbar sei. Dem widersprach Casagrandi,¹⁾ der das Gummi nach der Methode von Nägeli und Loew nicht erhalten konnte. Sollte es aber überhaupt erhalten werden können, so stamme es keinesfalls aus der Zellwand; denn während die Zellen Sporen treiben, finde man auch in dem Zellinhalt eine ähnliche schleimartige Substanz.

Ein ähnliches gummiartiges Produkt erhielt Hessenland²⁾ auf etwas andere Weise: Er kochte frische Preßhefe dreimal je 6 Stunden lang mit etwas Kalkmilch, entkalkte die erhaltene Lösung mit Ammoniumoxalat, engte das Filtrat ein und fällte dann mit Alkohol eine gummiartige Masse aus. Wurde das Gummi mehrere Tage mit absolutem Alkohol behandelt, so ließ es sich zu einem weißen Pulver zerreiben, das er zunächst mit Alkohol und Äther wusch und dann trocknete. Dieses Präparat unterschied sich von den vorher besprochenen durch seine geringere Löslichkeit in Wasser und durch sein spezifisches Drehungsvermögen. Hessenland fand hierfür den Wert $\alpha_D = +98,17^\circ$, also bedeutend mehr, als die anderen Präparate zeigten. Bei der Hydrolyse entstanden Mannose und Dextrose. Die Elementaranalyse ergab eine Zusammensetzung, die auf die $C_6H_{10}O_5$ stimmte, während die von Nägeli und Loew gefundenen Zahlen der Formel $C_{15}H_{22}O_{11}$ näher kamen.

Ungefähr gleichzeitig stellte Salkowski³⁾ und später Oshima⁴⁾ aus Hefe ein Gummi dar, das von allen wohl das einheitlichste sein dürfte. Sie benutzten zur Reinigung die Fäll-

¹⁾ Zentralblatt f. Bakteriol. u. Parasitenkunde, Bd. III, S. 574 (1897).

²⁾ Zeitschrift d. Vereins für die Rübenzuckerindustrie des Deutschen Reiches, Bd. XLII, S. 671 (1892).

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 497 u. 925 (1894).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 42 (1902).

barkeit des Hefegummis mit Fehling'scher Lösung. Sal-kowski fand die Zusammensetzung der Formel $C_{12}H_{22}O_{11}$ entsprechend: das spezifische Drehungsvermögen bestimmte er zu $+90,1^\circ$. Die Fällungsreaktionen waren die gleichen, wie bei den vorher erwähnten Präparaten.

Zur Nachprüfung dieser so sehr von einander abweichenden Befunde stellten wir uns nach den verschiedenen Verfahren jeweils ein Präparat her. Den «Pilzschleim» von Nägeli und Loew erhielten wir auf folgende Weise: 400 g trockne, durch Ausziehen mit Alkohol und Äther bereits von Fett befreite Hefe wurde in einer Porzellanschale mit 3 l Wasser 15 Stunden lang im Sieden erhalten, wobei das verdampfte Wasser von Zeit zu Zeit wieder ersetzt wurde. Nach dem Erkalten gaben wir die ganze Masse in ein hohes Standgefäß, ließen zwei Tage absitzen und hebten die klare Flüssigkeit so weit als möglich ab. Der Rückstand wurde zentrifugiert (1500—1600 Umdrehungen in der Minute) und die Lösung abgegossen. Nur auf diese Weise läßt sich in verhältnismäßig kurzer Zeit eine Trennung des Ungelösten erreichen; denn es ist fast unmöglich, Hefeabkochungen, gleichgültig ob sie neutral, basisch oder sauer reagieren, zu filtrieren oder zu kolieren, da die Poren des Filters oder Koliertuchs sofort verstopft werden. Auch durch Abgießen oder Abhebern ließ sich die Lösung nur sehr schlecht von dem Rückstand trennen; die Gefäße mußten stets mehrere Tage stehen, bis sich das Ungelöste auch nur einigermaßen abgesetzt hatte. Durch dreiviertelstündiges Zentrifugieren ballte sich dagegen der Rückstand am Boden des Gefäßes zu einer so zähen Masse zusammen, daß sich die überstehende Lösung vollkommen klar abgießen ließ. Diese Lösung wurde nun solange mit Bleiessig versetzt, als sich noch ein Niederschlag abschied. Hierdurch wurden die Eiweißstoffe und andere Verunreinigungen entfernt. Auch von diesem Niederschlag wurde die Lösung durch Zentrifugieren getrennt, dann das überschüssige Blei mit Schwefelwasserstoff gefällt, das Filtrat vom Bleisulfid auf etwa 100 ccm eingedampft und mit 300 ccm Alkohol versetzt, wodurch eine zähe, gelblichweiße Masse ausfiel. Durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen mit Al-

kohol nahm diese eine rein weiße Farbe an und ließ sich nach dem Trocknen mit Alkohol und Äther zu einem staubfeinen Pulver zerreiben. Das noch nicht vollkommen trockene Gummi war sehr hygroskopisch. Diese Eigenschaft verlor sich aber völlig, wenn es mehrere Tage im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet wurde. Die Ausbeute betrug etwa 4% der Trockensubstanz der Hefe. Frische Hefe gab eine etwas bessere Ausbeute als die getrocknete. Warum es Casagranti nicht gelungen ist, das Präparat zu erhalten, ist nicht wohl einzusehen.

Das erhaltene Pulver löste sich in Wasser, Alkalien und Säuren leicht zu einer gelblichen, schwach opalisierenden Flüssigkeit. Außer durch Alkohol wird es durch alkalische Bleiessiglösung, Barytwasser und Fehlingsche Lösung gefällt, ohne dabei reduzierend zu wirken. Es zeigte also dieselben Reaktionen wie das von Nägeli und Loew erhaltene Gummi.

Zum genaueren Vergleich bestimmten wir das spezifische Drehungsvermögen eines Präparates, das durch dreimaliges Fällen mit Alkohol erhalten war. Die Fällung wurde derart ausgeführt, daß die mäßig konzentrierte Gummilösung unter Umrühren in feinem Strahl in die 5—10fache Menge absoluten Alkohols gegossen wurde. Man darf die Lösung nicht zu konzentriert anwenden, sonst ballt sich das Gummi sogleich zu Klumpen zusammen und die erzielte Reinigung ist nur unbedeutend. Andererseits darf die Lösung auch nicht zu verdünnt sein, da das Gummi dann in sehr feiner Verteilung ausfällt und sich nicht absetzt. Ein Abfiltrieren ist aber infolge der schleimigen Beschaffenheit unmöglich. Wenn sich das Gummi abgesetzt hat, gießt man die überstehende Flüssigkeit ab und ersetzt sie durch frischen, absoluten Alkohol. Dieser entzieht dem Gummi im Verlauf eines Tages fast alle Feuchtigkeit, so daß man es jetzt auf einer Nutsche absaugen und mit Alkohol und Äther vollends trocknen kann. Diese Operationen wurden dreimal wiederholt und das so erhaltene aschefreie Pulver im Trockenschrank 15 Stunden bei 110° getrocknet. Viel höher durfte die Temperatur nicht gesteigert werden, da sonst ein Teil der Substanz in einen wasserunlöslichen Zustand überging, in einzelnen Fällen sich sogar zersetzte. Zur Bestimmung des

spezifischen Drehungsvermögens wurden etwa 1⁰/₁₀ige Lösungen verwandt; konzentriertere Lösungen waren zu stark gefärbt, um im längeren Rohr noch eine genaue Ablesung zu erlauben.

I. 0,4554 g trockne und aschefreie Substanz wurde in Wasser zu 50 ccm gelöst.

A. Im 10 cm-Rohr:

Größte abgelesene Drehung	+	0,57°
Kleinste „ „	+	0,52°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	0,54°
Daraus berechnet sich α_D	=	+ 59,3°

B. Im 20 cm-Rohr:

Größte abgelesene Drehung	+	1,09°
Kleinste „ „	+	0,99°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	1,05°
Daraus berechnet sich α_D	=	+ 57,6°

Als Mittelwert ergibt sich demnach $\alpha_D = + 58,5^\circ$ in neutraler Lösung.

Durch zwei weitere Bestimmungen suchten wir den Einfluß von Säuren oder Basen auf das Drehungsvermögen festzustellen.

II. 0,5160 g trockene und aschefreie Substanz wurde mit 5 ccm Natronlauge versetzt und auf 50 ccm aufgefüllt. Im 10 ccm-Rohr ergab sich als

Größte abgelesene Drehung	+	0,65°
Kleinste „ „	+	0,54°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	0,60°
Daraus berechnet sich α_D	=	+ 58,1°

Der Zusatz von Alkali hat also keinen Einfluß auf das Drehungsvermögen, es kann daher die Substanz durch das Alkali keine wesentliche Änderung erfahren haben. Auch längeres Kochen der alkalischen Lösung vor der Bestimmung änderte nichts.

III. 0,4554 g trockene und aschefreie Substanz wurde in Wasser zu 50 ccm gelöst. 40 ccm dieser Lösung wurden mit 5 ccm verdünnter Salzsäure versetzt. Im 20 cm-Rohr wurde gefunden als:

Größte abgelesene Drehung	+	0,92°
Kleinste „ „	+	0,84°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	0,87°
Daraus ergibt sich α_D	=	+ 53,7°

Es hat also eine erhebliche Abnahme des Drehungsvermögens stattgefunden, die bei vorherigem Erwärmen der Lösung noch größer wurde. Diese Abnahme ist durch die allmähliche Hydrolyse der Substanz bedingt, die sich auch durch die Reduktion von Fehlingscher Lösung zu erkennen gab. Das Gummi geht nun aber, wie wir gleich zeigen werden, bei der Hydrolyse in Dextrose und Mannose über. Da für erstere das Drehungsvermögen $+ 52,5^\circ$, für Mannose sogar nur $+ 14^\circ$ ist, und Mannose bei der Hydrolyse in größerer Menge gebildet wird, so muß natürlich das Drehungsvermögen abnehmen.

Unsere Zahlen stimmen wenig mit der von Nägeli und Loew erhaltenen ($\alpha_D = + 78^\circ$) überein, ziemlich gut dagegen mit der von Béchamp angegebenen ($\alpha_D = + 59-61^\circ$). Jedenfalls waren unsere Präparate noch unrein, wie schon aus der bräunlichen Farbe der Lösung hervorging. Verschiedene Versuche, das Gummi durch erneutes Lösen und Fällen oder auch durch Kochen der Lösung mit Tierkohle zu reinigen, hatten keine besseren Ergebnisse.

Um Aufschluß über die dem Gummi zugrunde liegenden Zuckerarten zu erhalten, erwärmten wir es 10 Stunden lang mit der 15fachen Menge 3%iger Schwefelsäure am Rückflußkühler auf dem Wasserbad, wobei sich fast alles löste. Die Säure wurde dann mit Schlemmkreide neutralisiert, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat im Vakuumapparat zur Sirupdicke eingedampft: die Temperatur stieg hierbei niemals über 20° . Der Sirup wurde mit heißem, verdünntem Alkohol behandelt, wobei etwas Gips zurückblieb, die Lösung wieder eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen. Diese Lösung wurde mit Tierkohle gekocht und das Eindampfen und Ausziehen noch zweimal wiederholt. Wir erhielten so einen hellgelben Sirup, der auch nach monatelangem Stehen nicht krystallisierte.

Dieser Sirup wurde nach dem Verfahren von Votoček¹⁾ in folgender Weise auf Mannose geprüft: 2 g Sirup wurden in

¹⁾ Votoček und Vondraček, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXXVII. S. 3854 (1904).

20 ccm Wasser gelöst und 1 g Phenylhydrazin mit etwas Eisessig hinzugegeben. Nach eintägigem Stehen in der Kälte war die Mischung zu einem rötlichbraunen Krystallbrei erstarrt, der abfiltriert, gut mit Alkohol und Äther gewaschen, und dann getrocknet wurde. Nach dreimaligem Umkrystallisieren aus Wasser zeigten die gut ausgebildeten, tafelförmigen Krystalle den Schmelzpunkt 196° und erwiesen sich damit als Mannosephenylhydrazon.¹⁾ Als das Filtrat von dem Hydrazon eine Stunde auf dem Wasserbad erwärmt wurde, schieden sich nochmals reichlich Krystalle ab. Nach zweimaligem Umkrystallisieren stellten sie gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 205° dar. Sie sind hiernach Dextrosephenylosazon. Der Schmelzpunkt des reinen Dextroseosazons liegt nach Müther²⁾ bei $204\text{--}205^{\circ}$, nach Fischer³⁾ bei 205° , nach Tiemann und Kees⁴⁾ bei 206° , und nach Fischer und Hirschberger⁵⁾ bei 210° . Die großen Unterschiede in diesen Angaben erklären sich dadurch, daß die Schmelztemperaturen je nach der Art des Erhitzens sehr schwanken: bei schnellerem Erhitzen erhält man einen tieferen Schmelzpunkt als bei langsamem. Durch Versuche haben wir uns überzeugt, daß die Schwankungen bis 8° betragen können. Wir führten deshalb die Schmelzpunktbestimmungen stets gleichzeitig mit zwei Röhrchen aus, von denen das eine die zu untersuchende Substanz, das andere reines Dextrosephenylosazon enthielt. Beide Substanzen schmolzen gleichzeitig und zwar, wenn die Temperatur in etwa 5 Minuten von 20° auf 200° gesteigert wurde, bei 205° . Es unterliegt daher keinem Zweifel, daß die erhaltenen Krystalle Dextrosephenylosazon waren. Der Sirup bestand demnach aus Dextrose und Mannose, wobei letztere an Menge sehr überwog. Das Vorhandensein von Mannose ist Nägeli und Loew⁶⁾ entgangen.

¹⁾ Fischer und Hirschberger, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXII, S. 1155 (1889).

²⁾ Tabellen der Schmelzpunkte der Hydrazone und Osazone der Zuckerarten, Göttingen 1903.

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XX, S. 830 (1887).

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XVIII, S. 1660 (1885).

⁵⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXI, S. 1809 (1888).

⁶⁾ Liebigs Annalen, Bd. CXCIII, S. 322 (1878).

Zur Prüfung auf Galactose oxydierten wir den Sirup nach der Vorschrift von Gans und Tollens¹⁾ mit Salpetersäure. Auch nach mehrtägigem Stehen hatte sich keine Schleimsäure abgeschieden. Die Angaben von Schützenberger²⁾ und Béchamp³⁾ über das Vorkommen von Galactose beruhen demnach auf einem Irrtum. Um ganz sicher zu sein, daß in der Hefe keine Galactose liefernden Stoffe vorhanden sind, hydrolysierten wir frische Hefe zuerst mit 3%iger und den hierbei bleibenden Rückstand mit 30%iger Schwefelsäure, wobei sich die Hefe bis auf einen geringen Rest vollständig löste. Aus der mit Kreide neutralisierten Zuckerlösung wurden die Eiweißstoffe usw. mit Bleiessig ausgefällt. Die mit Schwefelwasserstoff entbleite Lösung wurde im Vakuum zur Sirupdicke eingedampft und der Sirup durch mehrmaliges Ausziehen mit Alkohol gereinigt. Mit essigsauerm Phenylhydrazin wurde daraus das Mannosephenylhydrazon (Schmelzpunkt 196°) und Dextrosephenylosazon (Schmelzpunkt 205°) dargestellt. Bei der Oxydation des Sirups mit Salpetersäure wurde auch hier keine Schleimsäure erhalten. Es sind demnach in der ganzen Hefe keine Galactose liefernden Stoffe enthalten.

Die Darstellungsweise des von Hessenland⁴⁾ beschriebenen Gummis ist bereits oben angedeutet. Wir erhielten nach seiner Methode ein weißes Pulver, das wir durch mehrmaliges Füllen mit Alkohol reinigten. In Wasser löste es sich mit bräunlicher Farbe. Es war offenbar noch ziemlich unrein, wie auch die Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens zeigte.

I. 0,4515 g aschefreie und trockene Substanz wurde in Wasser zu 50 ccm gelöst. Im 10 cm-Rohr fanden wir als

Größte abgelesene Drehung	+	0,47°
Kleinste	+	0,36°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	0,43°
Daraus berechnet sich α_D	=	+ 47,6°

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXI, S. 2149 (1888).

²⁾ Bull. de la Soc. chim. de Paris, 2^e sér., Bd. XXI, S. 204 (1874); Compt. rend., Bd. LXXVIII, S. 493 u. 698 (1874).

³⁾ Compt. rend., Bd. LXXVIII, S. 645 (1874).

⁴⁾ Zeitschrift d. Vereins f. d. Rübenzuckerindustrie des Deutschen Reiches, Bd. XLII, S. 671 (1892).

II. 0,3825 g aschefreie und trockene Substanz wurde zu 50 ccm gelöst. Im 20 cm-Rohr ergab sich als

Größte abgelesene Drehung	+	0,76°
Kleinste „ „	+	0,69°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	0,73°
Hieraus berechnet sich α_D	= +	47,7°

Das Gummi zeigte die gleichen Fällungsreaktionen wie das vorher besprochene Präparat. Durch Kochen mit 3%iger Schwefelsäure ging es, wie schon Hessenland gefunden hat, in Dextrose und Mannose über, die wir in Form ihres Osazons und Hydrazons nachwiesen.

Schließlich stellten wir uns auch noch eine größere Menge Hefegummi nach der von Salkowski¹⁾ angegebenen Methode her. Wir verfahren hierbei folgendermaßen: 400 g trockene, fettfreie Hefe wurden in einer großen Porzellanschale mit 3 l 3%iger Kalilauge erhitzt und die Lösung unter öfterem Umrühren eine halbe Stunde in gelindem Sieden erhalten; dann wurde die Lösung von dem Rückstand durch Abgießen und Zentrifugieren getrennt und mit 1500 ccm Fehlingschem Reagens versetzt. Beim Erwärmen auf dem Wasserbad schied sich die Gummi-Kupferverbindung als zähe Masse ab, die beim Waschen und Kneten mit Wasser bald zu einem festen Klumpen erstarrte. Dieser wurde in einer Reibschale mit wenig Salzsäure zerrieben und so die Verbindung wieder gespalten. Aus der trüben Lösung wurde das Gummi durch Zusatz der dreifachen Menge Alkohol gefällt. Nach dem Abgießen der alkoholischen Lösung wurde das Gummi in wenig Wasser gelöst und wieder mit Alkohol gefällt. Durch mehrmalige Wiederholung dieser Lösung und Fällung erhielten wir ein kupfer-, asche- und stickstoffreies, weißes Pulver, das dieselben Fällungsreaktionen wie die anderen Präparate zeigte. Der durch Hydrolyse mit 3%iger Schwefelsäure erhaltene Sirup gab mit Phenylhydrazin in der Kälte das bei 196° schmelzende Mannosephenylhydrazon. Beim Erwärmen des Filtrats fielen weitere Krystalle aus, die sich durch den Schmelzpunkt 205° und die Analyse als Dextrosephenylosazon erwiesen.

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 497 u. 925 (1894).

0,2361 g Substanz: 0,5180 g CO₂ und 0,1466 g H₂O.

$C_6H_{10}O_4 \cdot N \cdot NH \cdot C_6H_5)_2$. Ber.: C 60,3%, H 6,2%.

Gef.: > 59,8%, > 6,9%.

Bei der Oxydation des Sirups mit Salpetersäure erhielten wir keine Schleimsäure, wohl aber Zuckersäure, die in ihr Silbersalz übergeführt und analysiert wurde.

0,4192 g Substanz: 0,2134 g Ag = 50,9% (ber. 50,9%).

Hierdurch ist das Vorhandensein von Dextrose in dem Sirup mit Sicherheit nachgewiesen.

Zur Prüfung auf Pentosen destillierten wir einen Teil des Sirups mit Salzsäure (spez. Gew. 1,06). Das Destillat gab mit Anilinacetat eine schwache Rotfärbung, doch darf man hieraus nicht ohne weiteres auf das Vorhandensein von Pentosen schließen, da nach den Untersuchungen von Windisch,¹⁾ Stoklasa²⁾ und Weiser³⁾ auch Dextrose bei der Destillation mit Salzsäure geringe Mengen Furool liefert. Bei der Prüfung des Destillates auf Methylfurool durch Versetzen mit konzentrierter Salzsäure und Phloroglucin entstand kein Niederschlag, sondern nur eine schwache Gelbfärbung, was auf einen sehr geringen Gehalt an Methylfurool schließen läßt. Wenn man von diesen beiden immerhin etwas fraglichen Reaktionen absieht, wird also bei der Hydrolyse des Hefegummi nur Mannose und Dextrose gebildet.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Angaben von Salkowski⁴⁾ und Oshima⁵⁾ überein, abgesehen von der Furoolreaktion, die von beiden nicht erhalten wurde. Die Angabe Oshimas, daß auch Fukose in dem Gummi enthalten sei, stützt sich lediglich auf die schwache Methylfuroolreaktion: er hat weder die Fukose für sich dargestellt, noch konnte er eine charakteristische Verbindung erhalten.

Um einen Anhalt über die quantitativen Verhältnisse zu bekommen, in denen Mannan und Dextran in dem Gummi vorkommen, wurden die gebildeten Mengen Mannosehydrason und

¹⁾ Chemikerzeitung, Bd. XXIV, Repert. S. 7 (1900).

²⁾ Zeitschrift für Zuckerindustrie in Böhmen, Bd. XXIII, S. 295.

³⁾ Die Landwirtschaftlichen Versuchsstationen, Bd. LII, S. 219.

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 497 u. 925 (1894).

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 42 (1902).

und Dextroseosazon gewogen. Wir erhielten aus der gleichen Menge Sirup 1,2 g Hydrazon und 0,8 g Osazon. Da sich nun die Molekulargewichte dieser Verbindungen wie 3:4 verhalten, so sind doppelt soviel Mannangruppen in dem Gummi enthalten wie Dextrangruppen.

Die Versuche, das spezifische Drehungsvermögen zu bestimmen, hatten anfangs keinen Erfolg, da die Lösung wenig durchsichtig war und die Ablesungen infolgedessen sehr unsicher wurden. Erst die Filtration durch eine Tonzelle ergab uns eine ganz klare Lösung, die nur noch schwach gelblich gefärbt war. Aus dieser Lösung fällten wir das Gummi wieder mit Alkohol und führten mit dem so gewonnenen Präparat die Bestimmung des Drehungsvermögens aus.

0,5244 g trockene und aschefreie Substanz wurde in Wasser zu 50 ccm gelöst. Im 20 cm-Rohr wurden gefunden als:

Größte abgelesene Drehung	+	1,93°
Kleinste „ „	+	1,85°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	1,88°
Hieraus ergibt sich $\alpha_D =$	+	89,6°

Diese Zahl stimmt mit dem von Salkowski gefundenen Wert $\alpha_D = +91,1^\circ$ so gut überein, wie man es unter den vorliegenden Umständen erwarten darf. Die gleiche Übereinstimmung zeigte auch die Analyse.

0,2350 g Substanz: 0,3612 g CO_2 und 0,1417 g H_2O .

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. Ber.: C 42,1%, H 6,4%

Gef.: „ 41,9%, „ 6,7%

Wie schon Salkowski gefunden hat, kommt dem Gummi die Formel $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ zu.

Zur besseren Vergleichung stellen wir die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen über das Hefegummi nochmals kurz nebeneinander.

Substanz	Formel	Spezifisches Drehungsvermögen
I. Pilzschleim, durch Kochen mit Wasser erhalten:		
a) Nägeli und Loew	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	+ 78°
b) Béchamp	—	+ 59–61°
c) Schützenberger	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	—
d) Meigen und Spreng	—	+ 58,5°

II. Gummi, durch Kochen mit Kalk erhalten:

a) Hessenland	$C_6H_{10}O_5$	+ 98,2°
b) Meigen und Spreng	—	+ 47,6°

III. Gummi, durch Kochen mit verdünnter Kalilauge und Fällen mit Fehlingscher Lösung dargestellt:

a) Salkowski	$C_{12}H_{22}O_{11}$	+ 90,1°
b) Meigen und Spreng	„	+ 89,6°

Alle Präparate zeigen die gleichen Fällungsreaktionen und alle gehen bei der Hydrolyse mit Schwefelsäure in Mannose und Dextrose über. Es unterliegt daher wohl keinem Zweifel, daß ihnen allen derselbe Stoff zugrunde liegt, der nur durch mehr oder weniger große Mengen fremder Stoffe verunreinigt ist.

Am wenigsten rein ist das nach Hessenland dargestellte Gummi. Das im Zellinhalt vorkommende Glykogen¹⁾ wird beim Kochen mit Kalk mit ausgezogen; da es durch Ammoniumoxalat nicht gefällt wird, gelangt es beim Fällen mit Alkohol mit in den Niederschlag. Eine zweite Verunreinigung ist eine Hemicellulose: sie geht ebenfalls beim Kochen mit Kalk allmählich in Lösung, fällt nicht mit Ammoniumoxalat, wohl aber mit Alkohol. Da nun Glykogen nach Böhm und Hoffmann²⁾ ein spezifisches Drehungsvermögen von + 226,7°, nach Landwehr³⁾ von + 213,3°, nach Külz⁴⁾ von + 211° zeigt, da wir ferner für die Hemicellulose ein Drehungsvermögen von + 113,5° ermittelt haben (s. u.), so wird je nach der Menge dieser Verunreinigungen das Drehungsvermögen wechseln. Die wässrige Lösung dieses Gummis gibt mit Trichloressigsäure eine Trübung, wohl von eiweißartigen Stoffen herrührend, eine Reaktion, die das reine Gummi nicht zeigt. Wir haben es also bei dem Hessenlandschen Gummi mit einem Gemisch von mindestens

¹⁾ Errera, Compt. rend., Bd. CI, S. 253 (1885); Laurent, Zentralblatt f. Agrikulturchemie, 1891, S. 358; Cremer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXII, S. 2062 (1899).

²⁾ Jahresberichte über die Fortschritte der Tierchemie, 1877, S. 67

³⁾ Diese Zeitschrift, VIII, S. 171 (1874).

⁴⁾ Jahresberichte über die Fortschritte der Tierchemie, 1880, S. 81.

vier Stoffen zu tun. Alle diese Beimengungen sind aber mit Fehlingscher Lösung nicht fällbar. Hierdurch war ein einfacher Weg zur Reinigung des Gummis gegeben.

Wir lösten unser Präparat in Wasser, fällten mit Fehlingscher Lösung die Gummikupferverbindung, zersetzten diese mit Salzsäure, fällten das Gummi mit Alkohol und reinigten es durch mehrmaliges Fälln aus wässriger Lösung. Wir erhielten so ein rein weißes, asche- und stickstoffreies Pulver, das dieselben Eigenschaften wie das nach Salkowski dargestellte Gummi besaß. Das spezifische Drehungsvermögen fanden wir nunmehr zu $+ 89,2^\circ$.

0,5130 g Substanz wurde in Wasser zu 50 ccm gelöst. Im 20 cm-Rohr ergab sich als:

Größte abgelesene Drehung	+	1,85°
Kleinste „ „	+	1,75°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	1,83°
Daraus berechnet sich α_D	=	$+ 89,2^\circ$

Das so gereinigte Gummi stimmt also mit dem Salkowskischen Präparat überein.

In der gleichen Weise behandelten wir auch unser nach der Methode von Nägeli und Loew dargestelltes Präparat. Welcher Natur die in ihm enthaltenen Verunreinigungen waren, konnten wir nicht ermitteln, jedenfalls ist es weder die Hemicellulose, noch Glykogen, da beide durch Bleiessig gefällt werden. Das spezifische Drehungsvermögen des gereinigten Gummis fanden wir zu $+ 89,1^\circ$.

0,5250 g Substanz zu 50 ccm gelöst. Im 20 cm-Rohr ergab sich als:

Größte abgelesene Drehung	+	1,94°
Kleinste „ „	+	1,83°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	1,87°
Daraus ergibt sich α_D	=	$+ 89,1^\circ$

Umgekehrt kochten wir das nach Salkowski dargestellte Gummi mehrere Stunden mit Kalkmilch. Die Bestimmung des Drehungsvermögens zeigte, daß es sich hierdurch nicht verändert hatte.

Aus der Tatsache, daß das Endprodukt aller Operationen das Salkowskische Hefegummi ist, und daß es ferner

nicht gelang, das Gummi noch weiter zu zerlegen, ist zu schließen, daß dieses Gummi wirklich einen einheitlichen Körper darstellt, und zwar ein Dextromannan, in dem doppelt soviel Mannan wie Dextran enthalten ist.

Es wäre nun noch die Frage zu beantworten, woher eigentlich das Gummi stammt, ob aus dem Zellinhalt oder aus der Zellwand. Eine Entscheidung hierüber ist nicht so leicht zu treffen. Zwar ist es von Wroblewski¹⁾ in dem nach Buchner dargestellten Hefepreßsaft nachgewiesen worden, aber ob es nicht außerdem auch in der Zellwand enthalten ist, vielleicht in einer schwerlöslichen Form, ist dadurch nicht ausgeschlossen. Denn es ist nicht möglich, durch Auspressen die Zellen völlig von ihrem Inhalt zu befreien. Andererseits kann man auch das Zellplasma nicht ausziehen, ohne daß ein Teil der Wand mit in Lösung geht. Die Tatsache aber, daß nach zweimaligem, je halbstündigem Kochen der Hefe mit dreiprozentiger Natronlauge alles Gummi gelöst ist, daß dagegen nach fünfmaligem, je zehnstündigem Kochen mit Wasser immer noch neue Gummimengen erhalten werden können, macht es sehr wahrscheinlich, daß das Gummi wohl größtenteils in schwerlöslicher Form in der Zellwand enthalten ist.

II. Die Hefecellulose.

Wie schon vorher erwähnt, nahmen Nägeli und Loew an, daß die ganze Hefezellwand bei genügend langem Kochen mit Wasser in «Pilzschleim» übergehe. Die Irrtümlichkeit dieser Ansicht läßt sich leicht nachweisen. Kocht man Hefe dreimal je eine halbe Stunde mit 3%iger Kalilauge, so erhält man zwar in der dritten Abkochung auch noch einen Niederschlag mit Alkohol. Er unterscheidet sich aber von dem Hefegummi dadurch, daß er aus seiner wässrigen Lösung durch Fehling'sche Lösung nicht gefällt wird. Über den nach Entfernung des Hefegummis bleibenden Rückstand finden sich in der Literatur sehr widersprechende Angaben. Die ersten Untersuchungen über diese Stoffe hat Mulder²⁾ angestellt. Er fand in der

¹⁾ Journal f. prakt. Chemie (N. F.), Bd. LXIV, S. 33 (1901).

²⁾ Allgemeine physiologische Chemie, Braunschweig 1851, S. 315.

Hefezellwand die «Hefecellulose», einen Stoff, der durch Jod und Schwefelsäure braun gefärbt wurde und sich hierdurch wie auch noch in einigen anderen Eigenschaften von der gewöhnlichen Cellulose unterscheidet. Ebenso vertraten natürlich auch Nägeli und Loew,¹⁾ ferner Schützenberger und Destrem,²⁾ sowie Gilson³⁾ die Ansicht, daß die Hefezellwand keine echte Cellulose enthalte, oder daß diese sich wenigstens in einem anderen Zustand darin vorfände als in den Zellwänden der höheren Pflanzen.

Schloßberger⁴⁾ erhielt durch wiederholte Behandlung der Hefe mit Natronlauge und Essigsäure einen Körper, der mit Jod gelb gefärbt wurde und dessen Zusammensetzung der der Cellulose entsprach; er glaubte daher annehmen zu dürfen, daß die Grundlage der Hefezellwand mit echter Cellulose übereinstimme. Zu demselben Ergebnis kamen in neuerer Zeit Liebermann und Bitto,⁵⁾ die auch echte Cellulose in der Hefe gefunden zu haben glaubten. Sie behandelten Hefe mehrere Stunden mit verdünnter Salzsäure (1:1), in der ein wenig Kaliumchlorat gelöst war, erwärmten dann das Gemisch auf dem Wasserbad, bis schwache Bräunung eintrat, filtrierten und wuschen den Rückstand aus. Diesen kochten sie je eine halbe Stunde erst mit 1¼%iger Essigsäure, dann mit 1¼%iger Kalilauge. Das auf diese Weise erhaltene Produkt zeigte die Zusammensetzung der Cellulose und gab mit Chlorzinkjodlösung die typische blaue Cellulosereaktion.

Ein Jahr später gelang es Salkowski,⁶⁾ die «Hefecellulose» durch Erhitzen mit Wasser unter Druck in zwei verschiedene Stoffe zu spalten. Der eine Bestandteil, von Salkowski als Erythrocellulose bezeichnet, löste sich hierbei auf und konnte aus der Lösung durch Alkohol wieder ausgefällt werden. Er wurde durch Jod braun gefärbt; seine wässerige

¹⁾ Liebigs Annalen, Bd. CXCIII, S. 322 (1878).

²⁾ Compt. rend., Bd. LXXXVIII, S. 383 (1879).

³⁾ La Cellule, Bd. IX, S. 274.

⁴⁾ Liebigs Annalen, Bd. LI, S. 207.

⁵⁾ Zentralblatt f. Physiologie, Bd. VII, S. 857 (1893).

⁶⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 3325 (1894).

Lösung opalisierte stark; durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure ging er in Dextrose über. Das spezifische Drehungsvermögen der Erythrocellulose bestimmte Salkowski zu $+173^{\circ}$; die Elementaranalyse ergab die Formel $C_6H_{10}O_5$. Der unlösliche Teil, die Achroocellulose, färbte sich nicht mit Jod. Bei der Hydrolyse gab sie Dextrose und Mannose.

Casagrandi¹⁾ und van Wisselingh²⁾ wiesen durch mikroskopische Untersuchungen die Abwesenheit echter Cellulose, letzterer auch die Abwesenheit von Chitin in der «Hefecellulose» nach.

Mangin³⁾ endlich fand in der Hefezellwand auf Grund gleicher Untersuchungen Callose, einen Stoff, von dem außer dem Namen bis jetzt so gut wie nichts bekannt ist.

Die Erklärung für diese widersprechenden Angaben ist wohl darin zu suchen, daß unsere Kenntnisse über die Gruppe der Cellulosen bis vor wenigen Jahren sehr mangelhaft waren. Erst in letzter Zeit ist dies zumal durch die Arbeiten von Cross und Bevan, Schulze, Winterstein, Tollens u. a. anders geworden. Nach dem Vorgang von Schulze⁴⁾ unterscheiden wir zwischen echten Cellulosen, die in heißen verdünnten Alkalien und Säuren unlöslich, in Kupferoxydammoniak löslich sind und durch Chlorzinkjodlösung blau gefärbt werden, und der Gruppe der Hemicellulosen, die schon beim Kochen mit verdünnten Säuren in Zucker gespalten werden.

Um die Hefe zur Prüfung auf diese Stoffe von Hefegummi zu befreien, ohne irgend erhebliche Verluste an etwa vorhandener Hemicellulose zu erfahren, behandelten wir 1200 g frische Hefe mit 121 $\frac{1}{4}$ % iger Kalilauge. Die Masse blieb unter öfterem Umrühren 14 Tage lang in der Kälte stehen. Wenn sich die Hefe einigermaßen abgesetzt hatte, wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen und durch frische Kalilauge ersetzt. Dies wurde anfangs alle 14 Tage, später in längeren Zwischenräumen wiederholt. Im ganzen war die Hefe

¹⁾ Zentralblatt f. Bakteriologie u. Parasitenkunde, Bd. III, S. 574 (1897).

²⁾ Jahrb. f. wissensch. Botanik, Bd. XXXI, S. 619 (1898).

³⁾ Journ. de Botanique, Bd. XIII, S. 204 (1899).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XVI, S. 391 (1892).

etwa sechs Monate mit der verdünnten Lauge in Berührung und wurde dann durch mehrfaches Abgießen und Zentrifugieren mit Wasser gut ausgewaschen. Der Rückstand wurde mit Alkohol angerührt und wieder zentrifugiert. Durch vier- bis fünfmalige Wiederholung dieser Behandlung, zuletzt mit absolutem Alkohol, wurde so ziemlich alles Wasser durch Alkohol ersetzt und die Hefe konnte jetzt an der Nutsche abgesaugt werden. Sie wurde darauf in einer großen Reibschale mit Äther verrieben, abgesaugt, nochmals mit Äther behandelt und wieder abgesaugt. Auf diese Weise erhielten wir staubtrockene Produkte. War die Hefe nicht ganz trocken, so backte sie in kurzer Zeit zu einer braunen spröden Masse zusammen. Gut getrocknet stellt sie ein feines, grauweißes Pulver dar. Von den angewandten 1200 g blieben uns 150 g oder 12,5 % Rückstand. Dies entspricht jedoch sicher nicht dem wirklichen Gehalt der Hefe an diesen Stoffen, denn einmal wird durch die lange Behandlung mit Lauge wohl auch ein Teil der Zellwand gelöst, und ferner geht durch das häufige Abgießen von der sich schlecht absetzenden Hefe doch eine gewisse Menge verloren. Das Präparat wird durch Jod und Schwefelsäure, sowie durch Jodjodkaliumlösung braun gefärbt, beim Auswaschen mit Wasser verschwindet jedoch diese Färbung wieder. Chlorzinkjodlösung bringt keine Blaufärbung hervor. In Kupferoxyd-ammoniaklösung, in der sich Filtrierpapier leicht auflöste, war die Substanz vollkommen unlöslich.

A. Das Hefedextran.

Um die in der Zellwand enthaltenen Hemicellulosen in die ihnen zugrunde liegenden Zucker zu spalten, wurden 20 g des vorher beschriebenen Präparats mit der 20fachen Menge dreiprozentiger Schwefelsäure 10 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Die Lösung wurde von dem unlöslichen Rückstand durch Zentrifugieren getrennt. Der Rückstand wog nach dem Trocknen 8,6 g. Die Lösung wurde zur Vervollständigung der Hydrolyse noch eine halbe Stunde am Rückflußkühler gekocht und dann in der üblichen Weise auf Zucker verarbeitet. Der schließlich erhaltene Sirup reduzierte Fehlingsche Lösung.

Mit Phenylhydrazin in Eisessiglösung lieferte er auch nach eintägigem Stehen nur Spuren eines Niederschlags. Es war somit in dem Sirup keine Mannose vorhanden, zugleich ein Beweis, daß das Ausgangsmaterial frei von Hefegummi war. Beim Erwärmen erstarrte die Mischung zu einem Krystallbrei. Nach dem Umkrystallisieren zeigten die hellgelb gefärbten, nadel-förmigen Krystalle den Schmelzpunkt 205° und erwiesen sich damit als Dextrosephenylosazon. Das Vorhandensein von Dextrose in dem Sirup wurde ferner durch Oxydation zu Zuckersäure sichergestellt, die in ihr Silbersalz umgewandelt und analysiert wurde.

0,2653 g Substanz: 0,1349 g Ag = 50,85% (ber. 50,9%).

Da bei der Oxydation keine Schleimsäure entstand, war Galactose in dem Sirup nicht enthalten. Ebenso ergab die Prüfung auf Pentosen und Methylpentosen deren Abwesenheit. Der Sirup enthielt also nur Dextrose.

Der bei der Hydrolyse gebliebene Rückstand wurde nochmals 10 Stunden lang am Rückflußkühler mit dreiprozentiger Schwefelsäure gekocht, wodurch noch 2,5 g in Lösung gingen. Der aus dieser Lösung gewonnene Sirup zeigte das gleiche Verhalten wie der erste und wurde daher mit diesem vereinigt und zur Krystallisation hingestellt. Nach einigen Monaten war der Sirup zu einer Krystallmasse erstarrt. Der Zucker wurde zweimal aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert und dann sein spezifisches Drehungsvermögen festgestellt.

0,4492 g wurden zu 50 ccm gelöst und die Drehung im 20 cm-Rohr bestimmt.

Größte abgelesene Drehung	+	0,95°
Kleinste „ „	+	0,85°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	0,92°
Hieraus ergibt sich $\alpha_D =$	+	51,2°

Da für reine Dextrose $\alpha_D = + 52,74^{\circ}$ ist, ist der Zucker auch hierdurch als Dextrose gekennzeichnet.

Die Hefezellwand enthält also ein Kohlehydrat, das wegen seiner Löslichkeit in heißer, verdünnter Säure als eine Hemicellulose zu bezeichnen ist. Und zwar ist es ein Dextran, da es bei der Hydrolyse ausschließlich Dextrose liefert.

Um diesen Stoff womöglich für sich darzustellen, wurde das von Hefegummi befreite Präparat vier Stunden lang mit 15%iger Natronlauge gekocht; es lösten sich hierbei etwa zwei Drittel der Substanz, ungefähr ebensoviel wie durch 20stündiges Erhitzen mit verdünnter Säure. Die Lösung wurde ziemlich stark eingedampft und dann mit der gleichen Menge Alkohol versetzt. Hierdurch fiel ein weißer, flockiger Niederschlag aus, der zur Entfernung des Natriumhydroxyds gut mit Alkohol ausgewaschen und in der bereits erwähnten Weise mit Alkohol und Äther getrocknet wurde. Da sich das Präparat noch als stark mit Natriumcarbonat verunreinigt erwies, wurde es wieder in Wasser gelöst, die Lösung genau mit Salzsäure neutralisiert und in einem Pergamentschlauch dialysiert, bis sich kein Chlor mehr nachweisen ließ, was nach vier Tagen der Fall war. Die Lösung wurde sodann eingedampft, mit Alkohol gefällt, und Lösen und Fällern noch zweimal wiederholt.

Das so erhaltene Präparat unterscheidet sich vom Hefegummi hauptsächlich dadurch, daß es mit Fehlingscher Lösung keinen Niederschlag gibt; von Bleiessig und Barytwasser wird es dagegen ebenso wie das Gummi gefällt. Die wässrige Lösung opalisiert ziemlich stark. Die Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens ergab folgende Zahlen.

0,4859 g trockene Substanz wurden zu 50 ccm gelöst. Im 10 cm-Rohr wurde gefunden als:

Größte abgelesene Drehung	+	1,12°
Kleinste „ „	+	1,04°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	1,10°
Daraus berechnet sich α_D	= +	113,2°

Im 20 cm-Rohr wurde gefunden als:

Größte abgelesene Drehung	+	2,24°
Kleinste „ „	+	2,09°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	2,19°
Hieraus ergibt sich α_D	= +	113,0°

Da dieser Stoff bei der Hydrolyse nur Dextrose liefert, ist er als «Hefedextran» zu bezeichnen. In dieser Form ist er natürlich nicht in der Hefezellwand enthalten. Denn während die Substanz in Wasser leicht löslich ist, wird die Zellwand

nur von verdünnten Säuren oder Alkalien angegriffen. Wir haben also nicht die eigentliche Hemicellulose vor uns, sondern ein wasserlösliches Umwandlungsprodukt.

Ein «Dextran aus Hefe» ist bereits von Wegner¹⁾ dargestellt worden. Er erhielt es durch wiederholtes Kochen von Hefe mit verdünnter Schwefelsäure und Fällen der erhaltenen Lösung mit Alkohol. Für das spezifische Drehungsvermögen fand Wegner fast denselben Wert wie Hessenland für sein Hefegummi, etwa $+98^{\circ}$. Mit diesem dürfte es wohl auch im wesentlichen übereinstimmen, wahrscheinlich war es nur noch weit unreiner. Hätte Wegner sein Produkt hydrolysiert, so würde er es wohl schwerlich «Dextran» haben nennen können, denn da es jedenfalls auch Hefegummi enthält, muß es bei der Hydrolyse auch Mannose liefern.

Mit Ausnahme des Drehungsvermögens stimmt unser Hefedextran in jeder Hinsicht mit der Erythrocellulose Salkowskis²⁾ überein. Die Erythrocellulose besitzt nach Salkowski ein spezifisches Drehungsvermögen von $+173,7^{\circ}$, dreht also bedeutend stärker als unser Dextran.

Um die beiden Stoffe mit einander vergleichen zu können, stellten wir uns nach den Angaben Salkowskis Erythrocellulose her, indem wir 5 g von dem bei der Darstellung des Hefegummis gebliebenen Rückstand 20 Stunden lang mit Wasser im Autoklaven bei einem Druck von 2—2 $\frac{1}{2}$ Atmosphären erhitzen. Die entstandene Lösung wurde eingedampft und mit Alkohol gefällt, der Niederschlag mehrere Stunden bei 120 $^{\circ}$ getrocknet, dann mit Wasser ausgezogen und die Lösung wieder mit Alkohol gefällt. Zur weiteren Reinigung wurde Lösung und Fällung noch zweimal wiederholt und das Präparat schließlich mit Alkohol und Äther getrocknet. Die wässrige Lösung zeigte etwa die gleiche Opalescenz wie eine gleich starke Lösung des Hefedextrans. Die Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens ergab fast denselben Wert wie beim Hefedextran.

¹⁾ Zeitschrift f. d. Zuckerindustrie d. Deutschen Reiches, Bd. XLII, S. 789 (1890).

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 3325 (1894).

0,4980 g trockene Substanz wurden zu 50 ccm gelöst.

Im 20 cm-Rohr war die

Größte abgelesene Drehung	+	2,30°
Kleinste	+	2,20°
Mittel aus 10 Ablesungen	+	2,24°
Daraus ergibt sich α_D	=	+ 112,5°

Wie die Salkowskische Erythrocellulose war unser Präparat mit Barytwasser fällbar, nicht aber mit Fehlingscher Lösung. Durch Jod und Schwefelsäure wurde es braun gefärbt. Beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure ging es in Dextrose über, die durch ihr Phenylsazon nachgewiesen wurde; ein anderer Zucker konnte in der Lösung nicht aufgefunden werden. Es unterliegt danach wohl keinem Zweifel, daß unser Hefedextran und die Erythrocellulose Salkowskis derselbe Stoff ist.

Salkowski hat die Frage aufgeworfen, ob die Erythrocellulose nicht vielleicht Glykogen sei. Da unsere Bestimmungen ein so sehr viel niedrigeres Drehungsvermögen ergeben haben, glauben wir diese Frage verneinen zu dürfen.

B. Die Hefecellulose.

Der nach dem Kochen mit verdünnter Schwefelsäure ungelöst bleibende Rest der Hefe stellte ein bräunliches, stickstoffreies Pulver dar, das mit Jod und Schwefelsäure keine dauernde, nicht auswaschbare Färbung gab. Der Kürze wegen wollen wir diesen Rest als «Hefecellulose» bezeichnen.

Die Unlöslichkeit eines Teils der Hefe muß sehr auffallen; denn kocht man frische Hefe mit verdünnter Schwefelsäure, so löst sie sich vollständig auf. Es müssen demnach durch die Behandlung mit Lauge und Säuren Änderungen in der Konstitution der Zellwandbestandteile vor sich gehen, welche die Schwerlöslichkeit der Zellwand bewirken. In der ursprünglichen Hefe kann jedenfalls von einem Cellulosegehalt keine Rede sein. Es blieb aber noch die Frage zu beantworten, ob nicht ein Teil der Zellwand durch die Einwirkung von Säuren und Lauge in echte Cellulose übergeführt wird, was einige Beobachter, wie schon erwähnt, gefunden zu haben glauben.

Ein entsprechendes Präparat stellten wir in folgender Weise her: 500 g trockene Hefe wurden zwei Tage mit 5%igem

Ammoniak bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen und dann mit Wasser ausgewaschen. Der Rückstand wurde mit 3%iger Salzsäure versetzt, nach dreitägigem Stehen in der Kälte gut ausgewaschen und mit 3%iger Kalilauge zwei Stunden lang gekocht. Dieses Auskochen wurde noch zweimal mit frischer Lauge wiederholt. Nachdem die Lauge durch Auswaschen mit Wasser völlig entfernt war, wurde der Rückstand zehn Stunden mit 3%iger Salzsäure gekocht, der ungelöste Rest wieder gut ausgewaschen und in der üblichen Weise scharf getrocknet. Die Ausbeute betrug 14 g oder rund 3%. Das graubraune, stickstofffreie Pulver war so gut wie unlöslich in verdünnten, heißen Säuren und Alkalien. Durch Behandlung mit Schulzeschem oder Hofmeisterschem Reagens wird es dagegen stark angegriffen. Erwärmt man die Masse nach dieser Behandlung mit verdünntem Ammoniak, so geht fast alles in Lösung. Eine Wiederholung dieser Behandlung führt völlige Auflösung herbei. Um die Löslichkeit in Kupferoxydammoniak festzustellen, wurde folgender Versuch ausgeführt. Etwa ein halbes Gramm wurde zehn Stunden bei 120° getrocknet und in einem kleinen Erlenmeyerkolben fünf Tage lang mit 50 ccm Kupferoxydammoniaklösung stehen gelassen. Der Rückstand wurde sodann in einem gewogenen Goochtiiegel abgesaugt, mit verdünntem Ammoniak, Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und wieder zehn Stunden getrocknet. Der beim Ansäuern des Filtrats ausfallende Niederschlag wurde in einen zweiten Goochtiiegel filtriert, ausgewaschen und getrocknet.

Angewandte Substanz 0,4909 g

Unlöslicher Rückstand 0,4677 >

Es wurden also gelöst 0,0232 >

Bei der Fällung der Lösung wurden 0,0115 g wieder erhalten.

Ein gleichzeitig angesetztter Versuch mit der gleichen Menge Filtrierpapier führte in zehn Minuten zur vollkommenen Lösung der Cellulose. Die geringe Auflösung darf man wohl auf die Einwirkung des in der Mischung enthaltenen konzentrierten Ammoniaks auf noch in dem Präparat zurückgebliebenes Hefedextran zurückführen.

Das Präparat wird durch Chlorzinkjodlösung nicht blau gefärbt, ebensowenig entstanden mit Jod und Schwefelsäure oder mit Jodjodkaliumlösung beständige Färbungen. Es zeigt also keine einzige der typischen Cellulosereaktionen.

Die Leichtlöslichkeit der Zellwand in frischem Zustand und der Mangel an Stickstoff in unserem Präparat schließt auch das Vorhandensein von Chitin in der Hefe aus. Während dieses sonst bei Pilzen sehr häufig vorkommt, ist seine Abwesenheit in der Hefe bereits auf mikrochemischem Wege, namentlich von van Wisselingh¹⁾ festgestellt worden.

Die Hefecellulose ist also keine echte Cellulose. Über die Natur der ihr zugrunde liegenden Zuckerarten suchten wir uns durch Hydrolyse Aufschluß zu verschaffen. Zu diesem Zweck wurde das Präparat zuerst zehn Stunden lang mit 10%iger Schwefelsäure am Rückflußkühler erhitzt und der Rückstand durch Zentrifugieren von der Lösung getrennt. Der ungelöste Rest wurde unter Kühlung mit 80%iger Schwefelsäure versetzt und zwei Tage stehen gelassen. Es war jetzt alles gelöst und hatte sich nur wenig Kohle abgeschieden. Nach gehöriger Verdünnung wurde von der Kohle abfiltriert, die beiden Filtrate wurden vereinigt und aus ihnen in üblicher Weise ein Zuckersirup dargestellt. Dieser Sirup gab mit essigsaurem Phenylhydrazin schon beim Stehen in der Kälte eine reichliche Menge Krystalle, die nach dem Umkrystallisieren bei 196° schmolzen und sich damit als Mannosephenylhydrazon erwiesen. Aus dem Filtrat des Hydrazons schieden sich beim Erwärmen auf dem Wasserbad nochmals soviel Krystalle ab, daß die Masse zu einem Brei erstarrte. Der Schmelzpunkt 204° zeigte, daß Dextrosephenylsazon vorlag. Zum weiteren Nachweis der Dextrose wurden einige Gramm Sirup mit Salpetersäure oxydiert; es entstand Zuckersäure, die in ihr Silbersalz verwandelt und analysiert wurde.

0,4882 g Substanz: 0,2487 g Ag = 50,9% (ber. 50,9%).

Schleimsäure war bei der Oxydation nicht gebildet worden. Andere Zucker konnten nicht nachgewiesen werden. Der Sirup enthielt also nur Mannose und Dextrose. Da sich die Ausbeuten

¹⁾ Jahrb. f. wissensch. Botanik, Bd. XXXI, S. 619 (1898).

an Hydrazon und Osazon annähernd wie 3:4 verhielten und die Molekulargewichte beider Stoffe im gleichen Verhältnis zu einander stehen, so war gleichviel Mannose und Dextrose im Sirup vorhanden. Die Hefecellulose ist demnach ein Mannosodextran oder Dextrosomannan.

Salkowski hat bereits versucht, diesen Stoff rein darzustellen, indem er den bei der Darstellung des Hefegummis gebliebenen Rückstand 20 Stunden lang im Autoklaven mit Wasser auf einen Druck von $2\frac{1}{2}$ Atmosphären erhitzte. Er behielt hierbei eine kautschukartige Masse übrig, die sich beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure nur teilweise löste und mehr Dextrose als Mannose lieferte. Im Gegensatz zur Erythrocellulose bezeichnet Salkowski diesen Stoff als Achroocellulose.

Wir stellten uns die Achroocellulose in der gleichen Weise wie Salkowski her. Sie zeigte ebenso wie unsere Hefecellulose keine der typischen Cellulosereaktionen. Bei der Hydrolyse erhielten wir einen Sirup, der mit dem aus der Hefecellulose vollkommen übereinstimmte.

Die beim Erhitzen im Autoklaven nebenbei entstehenden Huminstoffe entfernten wir, indem wir die Archroocellulose 14 Tage lang mit einer stark alkalischen Lösung von Wasserstoffsperoxyd behandelten, wobei sie sich zum Teil löste. Der Rückstand wurde gut ausgewaschen, mit Alkohol und Äther getrocknet. Er enthielt keinen Stickstoff und nur wenig Asche. Die Analyse ergab folgende Zahlen:

0,2143 g Substanz: 0,3505 g CO_2 und 0,1254 g H_2O .

$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$. Ber.: C 44,4%, H 6,2%

Gef.: > 44,6%, > 6,6%

Bei dem völlig übereinstimmenden Verhalten darf man wohl Hefecellulose und Achroocellulose für denselben Stoff ansehen.

Es fragt sich noch, ob dieses Mannosodextran überhaupt eine einheitliche Verbindung ist, oder ob nicht vielleicht die Dextrose aus einem ungelöst gebliebenen Rest des Hefedextrans stammt. Wir kochten deshalb die Hefecellulose nochmals 5 Stunden lang mit 25%iger Kalilauge, wobei sich noch ein erheblicher Teil löste. Der Rückstand wurde verzuckert und aus dem Sirup

das Mannosephenylhydrazon und das Dextrosephenylosazon dargestellt. Das Mengenverhältnis beider war das gleiche wie vorher, nämlich 3 : 4. Es sind also Mannan und Dextran in ganz gleicher Menge in Lösung gegangen. Man darf hieraus wohl schließen, daß das Dextran in der Hefecellulose mit dem Mannan chemisch verbunden ist und daß es von dem Hefedextran, das schon durch verdünnte Säuren und Alkalien gelöst wird, wesentlich verschieden ist. Auch dieses letzte Präparat zeigte keine der typischen Cellulosereaktionen.

Bezüglich der wasserunlöslichen Kohlehydrate der Hefezellwand haben unsere Untersuchungen somit folgendes ergeben.

Aus dem gummifreien Heferückstand läßt sich durch Kochen mit 15%iger Kalilauge ein Zellwandbestandteil ausziehen, der sich von dem Hefegummi durch sein spezifisches Drehungsvermögen unterscheidet, sowie dadurch, daß er mit Fehlingscher Lösung keine Kupferverbindung liefert. Dieser Stoff ist ein Dextran und stellt die wasserlösliche Form einer in der Zellwand vorhandenen Hemicellulose vor.

Wird dieses Dextran durch kochende Alkalien entfernt, so bleibt als Rückstand eine andere Hemicellulose von der Zusammensetzung $C_6H_{10}O_5$, die bei der Hydrolyse Dextrose und Mannose zu gleichen Teilen liefert. Dieser Zellwandbestandteil ist also ein Mannosodextran. Er ist in der ursprünglichen Hefe jedenfalls nicht in dieser Form enthalten, sondern entsteht erst durch längere Behandlung mit Lauge und Säure aus einer viel leichter hydrolysierbaren Hemicellulose.

Echte Cellulose ist in der Hefe weder ursprünglich vorhanden, noch wird sie durch Behandeln mit Säuren und Laugen gebildet. Ebenso ist auch Chitin in der Hefe nicht enthalten.

Freiburg i. Br., Chem. Universitätslaboratorium
(Abt. d. phil. Fak.).
