

# Die Synthese stickstoffhaltiger Stoffe im Macerationshefensaft.

Von

S. Kostytschew und W. Brilliant.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der Höheren Frauenkurse  
in St. Petersburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. Mai 1914.)

Der Macerationshefensaft nach v. Lebedew enthält bekanntlich nur minimale Mengen von löslichen Zuckerarten, aber beträchtliche Quantität von Eiweißstoffen. Auch die sogenannte «Endotryptase» ist im Macerationsssaft vorhanden, wodurch eine Untersuchung der Umwandlung von Hefeeiweiß bei Abwesenheit von Zymasegärung ermöglicht wird. Bisher war ein Studium der Proteolyse in Hefe bei Ausschluß von Zymasewirkung nicht möglich gewesen; es ist indes bekannt, daß zwischen Zymase und Endotryptase ein scharfer Antagonismus besteht; diese Tatsache wurde bereits von E. und H. Buchner und M. Hahn<sup>1)</sup> hervorgehoben und durch nachfolgende Untersuchungen verschiedener Forscher ausführlich erläutert.<sup>2)</sup>

Vom theoretischen Standpunkte aus ist die physiologische Bedeutung der Eiweißspaltung durch Hefefermente überhaupt nicht recht begreiflich; dieser Vorgang hat jedenfalls mit dem längst bekannten Eiweißabbau in keimenden Samenpflanzen gar nichts zu tun. Es ist jetzt bekannt, daß die Eiweißspaltung in keimenden Samen sich zum weitaus größten Teil auf die Reserveeiweiße bezieht;<sup>3)</sup> hierbei werden ja die schwer diffun-

<sup>1)</sup> E. und H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, S. 140 und 318 (1903).

<sup>2)</sup> N. Iwanoff, Zeitschrift f. Gärungsphysiologie, Bd. 1, S. 230 (1912). — O. Grigoriew und T. Gromow, Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 307 (1904) u. a.

<sup>3)</sup> Vgl. besonders W. Zaleski, Bot. Berichte, Bd. 29, S. 146 (1911).

dierenden Reservestoffe in krystallinische Verbindungen verwandelt; dies ist aber notwendig für den Transport der zu den vitalen Bedürfnissen des Embryos notwendigen stickstoffhaltigen Stoffe. Ganz anders verhält sich die Sache bei der Hefe. Die Eiweißstoffe der Hefe bilden den formativen Bestandteil des Zellplasmas, dessen Zertrümmerung in jeder Hinsicht nur schädlich sein könnte;<sup>1)</sup> auch von einem Transport der Eiweißstoffe kann in diesem Falle offenbar nicht die Rede sein.

Es ergab sich auch in der Tat, daß bei intensiver Zuckervergärung gar keine Eiweißspaltung in lebenden Hefezellen stattfindet;<sup>2)</sup> hierdurch wurde die Ansicht Detmers,<sup>3)</sup> der die Notwendigkeit von Eiweißabbau für das Stattfinden der alkoholischen Gärung voraussetzte, endgültig widerlegt. In lebenden Hefezellen findet also die Proteolyse nur bei der sogenannten Selbstgärung statt. In verschiedenen Präparaten von Dauerhefe, im Preßsaft und im Macerationssaft wird dagegen eine intensive Eiweißspaltung bei verschiedenen Verhältnissen bemerkbar. F. Kutscher<sup>4)</sup> hatte die scharfsinnige Annahme gemacht, daß in lebenden Hefezellen das «eiweißspaltende» Ferment im entgegengesetzten Sinne wirkt und also die für das Wachstum von Hefe notwendige Eiweißsynthese herbeiführt. Es ist gegenwärtig in der Tat bekannt, daß verschiedene Fermente je nach den äußeren Verhältnissen entweder hydrolytische Spaltungen oder im Gegenteil Synthesen bewirken.

Es könnte überraschend erscheinen, daß der Macerationsssaft eine starke proteolytische Wirkung hat, da, den Resultaten von Hahn und Geret<sup>5)</sup> nach, keine Diffusion von Endotryptase durch Pergamentpapier stattfindet; die Plasmahaut der Hefezellen sollte also keinen Austritt der Endotryptase gestatten. Es muß jedoch darauf aufmerksam gemacht werden, daß die «trockene Hefe» nach v. Lebedew, die immer wachstums-

<sup>1)</sup> W. Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Bd. 1, S. 533 (1897).

<sup>2)</sup> L. Iwanoff, Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 464 (1904).

<sup>3)</sup> Detmer, Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, S. 153 (1883). — Botah. Berichte, Bd. 10, S. 201 und 442 (1892).

<sup>4)</sup> F. Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 78 (1901).

<sup>5)</sup> Hahn und Geret, «Zymasegärung», S. 326 (1903).

fähig und also ohne Zweifel nicht abgetötet ist,<sup>1)</sup> sich von der normalen Hefe durch die Eigenschaften der Plasmahaut scharf unterscheidet. Wird z. B. gewöhnliche Preßhefe mit Wasser versetzt, so diffundiert selbst nach längerer Zeit keine nennenswerte Menge von Eiweiß aus den Zellen hinaus. Bei derselben Behandlung von «trockener Hefe nach v. Lebedew» findet man bereits nach wenigen Stunden eine beträchtliche Quantität von Hefeeiweiß in Wasser gelöst.

In der vorliegenden Mitteilung geben wir die Resultate einiger Versuche wieder, die als eine Orientierungsuntersuchung anzusehen sind. Es ergab sich, daß die Menge der im Macerationsaft enthaltenen Eiweißstoffe, besonders aber die proteolytische Wirksamkeit des Saftes je nach dem verwendeten Präparat von «Trockenhefe» bedeutenden Schwankungen unterliegen. Trotzdem haben wir einige allgemeine Regelmäßigkeiten wahrgenommen, die bei allen von uns untersuchten Präparaten zum Vorschein kamen.

Vor allem ist die Tatsache beachtenswert, daß bei der Autolyse von Macerationssaft eine geringe, aber ganz konstante Eiweißmenge auch in proteolytisch wirksamsten Säften und zwar bei langer Versuchsdauer unter günstigen Verhältnissen nicht angegriffen wird. Um die Eiweißspaltung zu befördern, haben wir, auf Grund der Angaben von Hahn und Geret<sup>2)</sup> die Hefensäfte mit einer berechneten Menge von Essigsäure versetzt und sämtliche Versuche im Brutschrank bei 34° ausgeführt. Die Stickstoffbestimmungen wurden nach Kjeldahl, die Bestimmungen von «Eiweißstickstoff» nach Stutzer ausgeführt. Bei der Berechnung von Prozentsätzen wurde in allen Versuchen die ursprüngliche Menge von Eiweiß-N im frischen Saft gleich 100 angenommen. Als Antiseptikum verwendeten wir Toluol.

### Versuch 1.

6 Portionen von Macerationssaft zu je 8 ccm. Eine jede Portion wurde mit 2 ccm 1,65%iger Essigsäure und 0,5 ccm

<sup>1)</sup> S. Kostytschew und W. Brilliant, Diese Zeitschrift, Bd. 85, S. 509 (1913).

<sup>2)</sup> Hahn und Geret, «Zymasegärung», S. 318 (1903).

Toluol versetzt.<sup>1)</sup> Zwei Kontrollportionen I und II wurden sofort für die Bestimmung von Eiweißstickstoff verwendet; die übrigen Portionen wurden für 6 oder 12 Stunden bei 34° stehen gelassen, dann ebenfalls für die Analyse verwendet.

Portion	Zeit in Stunden	Eiweiß-N in mg	Abgespaltener Eiweiß-N	
			in mg	in %
I	0	115,1	—	—
II	0	113,8	—	—
III	6	104,1	10,5	9,2
IV	6	103,6		
V	12	61,0	52,7	46,1
VI	12	62,4		

### Versuch 2.

Wiederherstellung des vorstehenden mit demselben Präparat von Dauerhefe, die Versuchsportionen wurden aber längere Zeit bei 34° aufbewahrt.

Portion	Zeit in Stunden	Eiweiß-N in mg	Abgespaltener Eiweiß-N	
			in mg	in %
I	0	114,5	—	—
II	0	115,2	—	—
III	24	23,1	91,5	79,7
IV	24	23,4		
V	48	9,7	104,4	90,9
VI	48	11,2		

### Versuch 3.

Ein anderes Präparat von «Trockenhefe». Die Bestimmung von Gesamtstickstoff in 8 ccm Saft ergab folgende Resultate: I 142,9 mg; II 141,7 mg. 8 Portionen zu je 8 ccm Saft, 2 ccm Essigsäure und Toluol (wie oben). Nach 2 Tagen wurden Portionen VII und VIII wiederum mit Toluol versetzt.

<sup>1)</sup> Nach den Angaben von Hahn und Geret ist dies die optimale Menge. Übrigens ist der Zusatz von Säure nur von geringer Bedeutung und wir haben uns also nicht mit der Aufgabe befaßt, die für unseren Fall optimalen Säuremengen ausfindig zu machen.



Portion	Zeit in Stunden	Eiweiß-N in mg	Abgespaltener Eiweiß-N	
			in mg	in %
I	0	99,2	—	—
II	0	100,3	—	—
III	24	57,9	40,8	40,9
IV	24	59,9		
V	48	13,3	87,1	87,4
VI	48	12,4		
VII	72	10,6	89,1	89,4
VIII	72	10,6		

## Versuch 4.

Ein anderes Präparat von «Trockenhefe». 6 Portionen zu je 8 ccm Macerationssaft, 2 ccm Essigsäure und 0,5 ccm Toluol.

Portion	Zeit in Stunden	Eiweiß-N in mg	Abgespaltener Eiweiß-N	
			in mg	in %
I	0	60,3	—	—
II	0	60,8	—	—
III	24	17,9	42,7	70,6
IV	24	17,8		
V	48	11,9	48,4	80,0
VI	48	12,3		

## Versuch 5.

Ein anderes Präparat von «Trockenhefe». 4 Portionen zu je 8 ccm Saft, 2 ccm Essigsäure und 0,5 ccm Toluol.

Portion	Zeit in Stunden	Eiweiß-N in mg
I	24	23,0
II	24	24,1
III	48	10,7
IV	48	10,4

## Versuch 6.

Ein anderes Präparat von Trockenhefe. 6 Portionen zu je 8 ccm Saft, 2 ccm Essigsäure und 0,5 ccm Toluol.<sup>1)</sup>

Portion	Zeit in Stunden	Eiweiß-N in mg	Abgespaltener Eiweiß-N	
			in mg	in mg
I	0	65,2	—	—
II	0	65,6	—	—
III	144	9,4	} 56,4	86,2
IV	144	8,7		
V	216	10,1	} 55,3	84,6
IV	216	10,1		

Es ergab sich also, daß in allen Saftpräparaten eine und dieselbe Menge von Eiweißstickstoff (etwa 10 mg) selbst nach 9-tägiger Autolyse hinterbleibt, während die Gesamtmenge von hydrolysierbarem Eiweiß bereits nach 2 Tagen zerlegt wird. Man könnte voraussetzen, daß die konstante Menge von nicht abgespaltenem Eiweißstickstoff im Ferment selbst enthalten ist. Es muß jedoch darauf aufmerksam gemacht werden, daß die Endotryptase der Hefe, den Angaben von Hahn und Geret<sup>2)</sup> nach kein Eiweißstoff ist: nach peinlicher Reinigung haben die genannten Forscher ein sehr wirksames Endotryptasepräparat erhalten, welches weder mit Gerbsäure noch mit Phosphorwolframsäure eine Fällung gab. Die Millonsche Probe und die Biuretreaktion fielen negativ aus. Leider haben Hahn und Geret nicht untersucht, ob dieses Präparat überhaupt stickstoffhaltig war. In unseren Versuchen war die Biuretreaktion selbst nach dauernder Autolyse der Säfte nicht verschwunden; obschon der Eiweißabbau, wie aus obigen Zahlen ersichtlich, sehr weit ging. Nach Ablauf von 2 Tagen war der Eiweißgehalt der Lösung so gering, daß nach dem Erhitzen gar keine Koagulation eintrat.

<sup>1)</sup> Das Toluol wurde von Zeit zu Zeit wieder zugegeben, wie es auch bei nachfolgenden lange dauernden Versuchen der Fall war. Wir betonen ausdrücklich, daß sämtliche Versuche bei vollkommen sterilen Verhältnissen ausgeführt worden waren.

<sup>2)</sup> Hahn und Geret, «Zymasegärung», S. 325 (1903).

Sind die hydrolysierbaren Eiweißstoffe im Macerations-saft zerlegt, so können synthetische Vorgänge eintreten. Um dies zu beweisen, haben wir den meist sauren Saft neutral oder schwach alkalisch gemacht und mit einer beträchtlichen Menge von Zucker versetzt, um die hydrolysierende Wirkung der Endotryptase herabzusetzen.<sup>1)</sup> Es ergab sich in der Tat, daß in dem auf diese Weise behandelten Saft beim weiteren Aufbewahren bei 34° eine bedeutende Vermehrung des mit Kupferhydroxyd fällbaren Stickstoffs stattfindet. In den Versuchstabellen wird der nach dem Stutzerschen Verfahren bestimmte Stickstoff immer der Kürze wegen als «Eiweiß-N» bezeichnet, obschon dieser Ausdruck vielleicht nicht ganz gerechtfertigt ist. Die Zunahme des «Eiweiß-N» wird immer in Prozenten des Gesamteiweißstickstoffs im frischen Saft angegeben.

### Versuch 7.

Zwei Saftportionen des Versuchs 6, die gleichzeitig mit den Portionen V und VI 9 Tage im Brutschrank bei 34° stehen geblieben sind, wurden nach Ablauf von weiteren 4 Tagen mit Natriumcarbonat annähernd neutral gemacht, mit je 4 g stickstoffreiem krystallinischen Traubenzucker<sup>2)</sup> versetzt, wiederum 7 Tage bei 34° stehen gelassen, dann für die Analyse verwendet. Die Eiweiß-N-Bestimmung ergab folgendes Resultat:

I. Eiweiß-N = 19,5 mg	}	Zunahme 13,6%
II.        >     = 18,5   >		

Obschon eine Entwicklung von Mikroorganismen bereits durch hohe Zuckerkonzentration gehemmt werden sollte, haben wir in diesem, wie auch in folgenden Versuchen täglich etwas Toluol in je eine Saftportion zugesetzt.

<sup>1)</sup> Hahn und Geret, «Zymasegärung», S. 316 (1903).

<sup>2)</sup> Die Kontrolle ergab folgende Resultate: I. Eiweiß-N in 8 ccm Saft nach der Autolyse: ohne Zucker 9,7 mg; nach Zusatz von 4 g Zucker 9,5 mg. II. Eiweiß-N in 8 ccm Saft nach der Autolyse: ohne Zucker 8,3 mg; nach Zusatz von 4 g Zucker 8,2 mg.

## Versuch 8.

4 Saftportionen zu je 8 ccm von demselben Hefepräparat wie im vorstehenden Versuche wurden mit je 2 ccm 1,65% iger Essigsäure und Toluol versetzt und 6 Tage bei 34° stehen gelassen. Dann wurden Portionen I und II für die Analyse verwendet; die beiden anderen Portionen wurden mit Natronlauge neutral gemacht und nach Zugabe von je 4 g Traubenzucker noch 9 Tage bei 34° stehen gelassen. Die Kolben wurden mit Gärverschuß nach Meissl versetzt und täglich gewogen; sie haben nicht die geringste Menge von CO<sub>2</sub> während 9 Tage abgeschieden. Die Eiweiß-N-Bestimmungen ergaben folgendes Resultat:

I. Kontrolle:	Eiweiß-N =	8,4 mg	
II. „	„ =	9,5 „	
III. Versuch:	„ =	17,0 „	} Zunahme 12,2%
IV. „	„ =	17,0 „	

## Versuch 9.

2 Saftportionen zu je 25 ccm Macerationssaft, 6,25 ccm 1,65% iger Essigsäure und 2,5 ccm Toluol wurden 48 Stunden bei 34° belassen. Dann wurde Portion I zur Analyse verwendet; Portion II wurde mit Ammoniumcarbonat alkalisch gemacht, mit 12,5 g Zucker versetzt und noch 4 Tage bei 34° aufbewahrt. Die Eiweiß-N-Bestimmung im frischen Saft ergab folgendes Resultat: Eiweiß-N in 10 ccm = 75,7 mg.

Portion I.	Eiweiß-N =	23,1 mg.
„ II. „	=	34,6 „ Zunahme 11,5 mg = 6%.

## Versuch 10.

Ein anderes Präparat von «Trockenhefe». Zwei Portionen zu je 30 ccm Macerationssaft unter denselben Verhältnissen wie im vorstehenden Versuche. Die Autolyse dauerte 3 Tage, die Synthese dauerte 4 Tage. 5 ccm frischen Saftes enthielten 46,2 mg Eiweiß-N. Eiweiß-N in 30 ccm 277,2 mg.

I. Kontrolle (nach der Autolyse)	. 28,5 mg Eiweiß-N.
II. Versuch . . . . .	42,8 „
	Zunahme von «Eiweiß-N» 14,3 mg oder 5,2%.



## Versuch 11.

Wiederholung des vorstehenden.

I. Kontrolle . . .	Eiweiß-N = 29,9 mg.
II. Versuch . . . . .	» = 41,9 »
	Zunahme von Eiweiß-N = 12,0 mg.

Bei einigen Präparaten von «trockener Hefe» werden die synthetischen Vorgänge durch Einengen des Saftes im Vakuum befördert. Die fermentativen Synthesen werden ja überhaupt in konzentrierten Lösungen herbeigeführt, während eine Verdünnung der Lösung den hydrolytischen Vorgängen günstig ist.

## Versuch 12.

6 Saftportionen zu je 8 ccm wurden unter Zusatz der üblichen Mengen von Essigsäure und Toluol bei 34° belassen; die Portion I aber nicht bei gewöhnlichem Druck, sondern im Vakuumexsikkator über Kaliumhydroxyd aufbewahrt. Nach 48 Stunden wurde sowohl diese als die bei Luftzutritt belassene Portion II für die Analyse verwendet; die vier anderen Portionen wurden mit Ammoniumcarbonat alkalisch gemacht, mit je 4 g Traubenzucker versetzt und im Vakuumexsikkator 24 Stunden bei 34° aufbewahrt. Dann wurden Portionen III und IV analysiert, die Portionen V und VI aber nach 48 Stunden bei gewöhnlichem Druck im Brutschrank belassen, dann ebenfalls für die Analyse verwendet. Eiweiß-N in 8 ccm frischen Saftes 60,5 mg.

I. Eiweiß-N	= 43,6 mg.	
II. »	= 9,2 »	
III. »	= 17,6 »	Zunahme 13,9%.
IV. »	= 16,6 »	» 12,2%.
V. »	= 18,9 »	» 16,0%.
VI. »	= 18,3 »	» 15,0%.

## Versuch 13.

3 Saftportionen zu je 30 ccm von demselben Hefepräparat wie im vorstehenden Versuche wurden mit je 7,5 ccm 1,65%iger Essigsäure und Toluol versetzt und 48 Stunden bei 34° aufbewahrt. Dann wurde Portion I für die Analyse verwendet,

Portion II wurde mit Ammoniumcarbonat schwach alkalisch gemacht, mit 15 g Traubenzucker versetzt und noch 3 Tage im Brutschrank belassen. Portion III wurde im Vakuumexsikkator über KOH etwa auf die Hälfte eingeeengt, dann mit 6 g Traubenzucker versetzt, alkalisch gemacht und bei gewöhnlichem Druck 3 Tage bei 34° belassen.

- I. Kontrolle . . . . . Eiweiß-N = 20,9 mg.
- II. Versuch nicht eingeeengt . . . = 29,8 »  
Zunahme 8,9 mg oder 3,9%.
- III. Versuch eingeeengt . . . Eiweiß-N = 42,8 mg.  
Zunahme 21,9 mg oder 9,6%.

#### Versuch 14.

Wiederholung des vorstehenden.

- I. Kontrolle . . . . . Eiweiß-N = 23,0 mg.
- II. Versuch nicht eingeeengt . . . = 41,8 »  
Zunahme 18,8 mg oder 8,3%.
- III. Versuch eingeeengt . . . Eiweiß-N = 53,2 mg.  
Zunahme 30,2 mg oder 13,3%.

Die synthetischen Vorgänge sind im allgemeinen nach 2 Tagen beendet, wie es aus folgenden Versuchen zu ersehen ist.

#### Versuch 15.

6 Saftportionen zu je 8 ccm. Nach 48stündiger Autolyse unter üblichen Verhältnissen wurden die beiden Kontrollportionen I und II für die Analyse verwendet; die 4 übrigen Portionen wurden mit je 4 g Traubenzucker und Ammoniumcarbonat versetzt und 3 oder 6 Tage bei 34° aufbewahrt.

Portion	Zeit in Tagen	Eiweiß-N	
		in mg	Zunahme in %
I	0	9,8	—
II	0	9,8	—
III	3	16,7	} 10,6
IV	3	16,8	
V	6	17,7	} 12,3
VI	6	18,1	

## Versuch 16.

Ein anderes Präparat von «trockener Hefe». 4 Portionen zu je 8 ccm. Nach 24stündiger Autolyse wurde Portion I für die Analyse verwendet, die anderen Portionen mit je 4 g Traubenzucker und Ammoniumcarbonat versetzt und bei 34° aufbewahrt. Nach Ablauf von 2 Tagen wurde täglich eine Portion analysiert.

Portion	Zeit in Tagen	Eiweiß-N in mg
I	0	13,4
II	2	22,0
III	3	22,2
IV	4	23,1

## Versuch 17.

Ein anderes Präparat von «trockener Hefe». 4 Portionen zu je 8 ccm. Dauer der Autolyse 48 Stunden. Dann wurde Portion I für die Analyse verwendet, die übrigen Portionen wurden mit Zucker versetzt, schwach alkalisch gemacht und bei 34° aufbewahrt. Täglich wurde eine Portion analysiert (die letzte nach 2 Tagen).

Portion	Zeit in Tagen	Eiweiß-N	
		in mg	Zunahme in %
I	0	12,2	—
II	1	17,0	8
III	2	19,6	12,3
IV	4	19,1	11,4

Wie bereits oben angedeutet, sind die synthetischen Vorgänge nur unter bestimmten Verhältnissen möglich. Die wichtigste Bedingung ist ein hinreichender Eiweißzerfall. Folgende Versuche zeigen, daß keine Synthese erfolgt, wenn die Menge von Eiweiß-N in Kontrollportionen 20 mg in je 8 ccm übersteigt.

## Versuch 18.

4 Saftportionen zu je 8 ccm. Die Analyse dauerte 24 Stunden. Dann wurden 2 Portionen analysiert, die beiden

anderen schwach alkalisch gemacht, mit je 4 g Zucker versetzt und noch 6 Tage bei 34° stehen gelassen; dann ebenfalls für die Analyse verwendet.

I. Kontrolle . . .	Eiweiß-N = 30,5 mg
II.     »     . . .	»     = 28,5   »
III. Versuch . . .	»     = 29,9   »
IV.     »     . . .	»     = 27,7   »

### Versuch 19.

Wiederholung des vorstehenden. 6 Saftportionen zu je 8 ccm. Die Autolyse dauerte 24 Stunden, das Aufbewahren mit Zucker 4 oder 5 Tage.

I. Kontrolle . . . . .	Eiweiß-N = 24,0 mg
II.     »     . . . . .	»     = 23,3   »
III. Versuch (4 Tage) . .	»     = 25,0   »
IV.     »     »     . . .	»     = 27,2   »
V.     »     (5 Tage) . .	»     = 24,7   »
VI.     »     »     . . .	»     = 25,1   »

Es hat also wiederum keine nennenswerte Zunahme von «Eiweiß-N» stattgefunden.

### Versuch 20.

Wiederholung der beiden vorstehenden Versuche. 4 Saftportionen zu je 8 ccm. Die Autolyse dauerte 24 Stunden, das Aufbewahren mit Zucker dauerte 8 Tage.

I. Kontrolle . . . . .	Eiweiß-N = 38,2 mg.
II.     »     . . . . .	»     = 38,2   »
III. Versuch . . . . .	»     = 27,5   »
IV.     »     . . . . .	»     = 27,6   »

In diesem Versuche hat also gar eine weitere Eiweißspaltung in Zuckerportionen stattgefunden, da der Eiweißgehalt vor der Zuckergabe ein sehr beträchtlicher war. Es muß allerdings darauf aufmerksam gemacht werden, daß ohne Zuckergabe die Menge von «Eiweiß-N» bereits nach 24 Stunden auf etwa 10 mg gesunken wäre, während in Gegenwart von Zucker bloß 11 mg Eiweißstickstoff in 8 Tagen abgespalten wurde.



## Versuch 21.

Zwei Saftportionen zu je 30 ccm von demselben Hefepräparat, wie im Versuch 10. Die Autolyse dauerte 2 Tage; das Aufbewahren mit Zucker dauerte 3 Tage.

Kontrolle . . . .	Eiweiß-N = 56,8 mg.
Versuch . . . .	» = 59,5 »

Im Versuch 10 war nach 3tägiger Autolyse der Eiweiß-N auf 28,5 mg gesunken; infolgedessen sind auch die synthetischen Vorgänge ermöglicht worden.

Die Abhängigkeit der synthetischen Vorgänge vom Eiweißgehalt des Saftes spricht deutlich dafür, daß die Synthese unter Mitwirkung des proteolytischen Fermentes zustande kommt.

Außerdem ist die Gegenwart großer Zuckermengen für die Synthese notwendig. Dagegen scheint es nicht von Wichtigkeit zu sein, ob der Saft nach Zuckerzusatz schwach sauer bleibt, oder alkalisch gemacht wird. Es ist auch gleichgültig, ob die Neutralisation mit  $\text{NH}_3$  oder mit  $\text{NaHO}$  vorgenommen wird. In Gegenwart von Eiweiß und beträchtlichen Mengen von Aminosäuren ist es überhaupt nicht immer leicht zu beurteilen, ob und inwieweit die tatsächliche  $\text{H}^+$ -Konzentration verändert wird. Wie gesagt, scheint jedoch dieser Umstand keine wichtige Rolle zu spielen. Folgende Versuche sollen die Bedeutung von Zucker erläutern.

## Versuch 22.

6 Saftportionen zu je 8 ccm. Die Autolyse dauerte 2 Tage. Dann wurden zwei Kontrollportionen I und II analysiert; die vier Versuchsportionen wurden mit Ammoniumcarbonat schwach alkalisch gemacht. Portionen III und IV wurden mit je 2 g Traubenzucker versetzt; Portionen V und VI sind zuckerfrei geblieben.

I. Kontrolle . . . . .	Eiweiß-N = 10,5 mg
II. » . . . . .	» = 11,9 »
III. Versuch mit Zucker . .	» = 16,5 »
IV. » » » . . . . .	» = 17,8 »
V. Versuch ohne Zucker . .	» = 10,7 »
VI. » » » . . . . .	» = 11,4 »

Die Menge von Eiweiß-N im frischen Saft war gleich 60,5 mg in 8 ccm. Mit Zuckergabe war also eine Zunahme von «Eiweiß-N» gleich 9,6% zu verzeichnen. Bei Abwesenheit von Zucker hat aber gar keine Synthese stattgefunden.

## Versuch 23.

9 Saftportionen zu je 8 ccm. Die Autolyse dauerte 48 Stunden. Dann wurden die beiden Kontrollportionen analysiert; von den Versuchsportionen wurden III und IV mit je 0,1 g Ammoniumcarbonat allein, V und VI mit je 0,1 g Ammoniumcarbonat und 0,25 g Zucker, VII und VIII mit je 0,1 g Ammoniumcarbonat und 2 g Zucker, IX mit 2 g Zucker allein versetzt. Die mit Ammoniumcarbonat versetzten Portionen reagierten schwach alkalisch, die Portion IX aber stark sauer auf Lackmus.

Portion	Zusatz	Eiweiß-N	
		in mg	Zunahme in %
I	Kontrolle . . . . .	14,4	—
II	» . . . . .	13,4	—
III	0,1 g Ammoniumcarbonat . . . . .	11,9	0
IV	0,1 » . . . . .	12,3	
V	0,1 » + 0,25 g Zucker	13,7	0
VI	0,1 » + 0,25 »	13,3	
VII	0,1 » + 2 g Zucker .	17,8	6,7
VIII	0,1 » + 2 » .	18,2	
IX	2 » Zucker . . . . .	19,5	9,2

Es ergab sich also, daß in Gegenwart von 2 g Zucker die Synthese sowohl bei schwach alkalischer, als bei saurer Reaktion erfolgt. Dagegen hat nicht nur bei vollkommener Abwesenheit von Zucker, sondern auch bei geringer Zuckerkonzentration keine Synthese stattgefunden. Dieser Umstand spricht vielleicht zugunsten der Annahme, daß die Wirkung von Zucker eine indirekte ist: durch hohe Zuckerkonzentration wird ja die hydrolytische Eiweißspaltung durch Endotryptase stark gehemmt. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß zu den synthetischen Vorgängen eine geringe Zuckermenge ver-

braucht wird. Wir haben in der Tat wahrgenommen, daß ein geringer Verbrauch von Zucker durch den Saft erfolgt, ob-  
schon hierbei keine Spur von  $\text{CO}_2$  entsteht, wie es aus dem  
Versuch 8 ersichtlich ist.

#### Versuch 24.

2 Saftportionen zu je 30 ccm. Die Autolyse dauerte  
48 Stunden; dann wurden beide Portionen durch Eindampfen  
im Vakuum auf je 10 ccm gebracht, mit Ammoniumcarbonat  
neutral gemacht und mit ganz gleichen, genau abgewogenen  
Zuckermengen versetzt. In der Portion I wurde der Zucker  
sofort bestimmt, in der Portion II nach dem 2tägigen Stehen  
bei  $34^\circ$  in Gegenwart von Toluol. Die Zuckerbestimmungen  
wurden nach der Methode von G. Bertrand<sup>1)</sup> ausgeführt.  
Hierbei erwies es sich als notwendig, die konzentrierten Zucker-  
lösungen bedeutend zu verdünnen. Infolgedessen ist die Ge-  
nauigkeit der Bestimmung auf etwa  $\pm 25$  mg Zucker zu schätzen.

A. Kontrolle . . . . .	Traubenzucker = 3,390 g.
B. Versuch . . . . .	» = 3,310 »
	Zuckerverbrauch 80 mg.

#### Versuch 25.

Wiederholung des vorstehenden. Die Versuchsportion  
wurde aber nach 4tägigem Stehen bei  $34^\circ$  analysiert.

A. Kontrolle . . . . .	Traubenzucker = 3,645 g.
B. Versuch . . . . .	» = 3,307 »
	Zuckerverbrauch 332 mg.

Diese vereinzelt Bestimmungen bedürfen noch einer  
Nachprüfung und wir wollen also einstweilen keine Schluß-  
folgerungen aus ihnen ziehen.

Auf Grund der vorstehend dargelegten Versuche halten  
wir die Tatsache für bewiesen, daß im Macerationshefensaft  
bei bestimmten Verhältnissen synthetische Vorgänge stattfinden,  
da keine bei der Hefenautolyse entstehenden krystallinischen

<sup>1)</sup> G. Bertrand, *Bullet. de la soc. chimique*, Bd. 35, S. 1285 (1906).

stickstoffhaltigen Verbindungen mit Kupferhydroxyd nach Stutzer fällbar sind. Obschon nur der «Proteinstickstoff» der laufenden Vorstellung nach bei der Behandlung nach Stutzer mit Kupferhydroxyd eine Fällung gibt, halten wir es dennoch für kaum zulässig, von einer fermentativen «Eiweißsynthese» ungezwungen zu sprechen, bevor man die gebildeten Stoffe isoliert und untersucht hat. Eine derartige Schlußfolgerung wäre auch in dem Falle übereilt, wenn bei synthetischen Vorgängen gleichzeitig eine Abnahme des Aminosäurenstickstoffes nachgewiesen würde, denn, abgesehen davon, daß ein weiterer Abbau von Aminosäuren nicht ausgeschlossen ist, könnten doch die Aminosäuren für verschiedenartige Synthesen verbraucht werden; wir verweisen u. a. auf die mannigfaltigen Produkte, die neuerdings von Galeotti<sup>1)</sup> beschrieben worden waren.

Wir verfügen in der Tat über Tatsachen, die zur Warnung gegen übereilte Schlußfolgerungen dienen können. So haben wir wahrgenommen, daß eine nennenswerte Synthese stickstoffhaltiger Stoffe nur nach dem Stutzerschen Verfahren, aber nicht durch Fällung mit Bleiessig nachgewiesen werden kann, während beide Methoden sowohl für frischen Macerationssaft, als für autolysierten Saft gleiche Werte ergeben.

### Versuch 26.

8 Saftportionen zu je 8 ccm. Die Autolyse dauerte 24 Stunden; dann wurden 4 Portionen analysiert; in Portionen I und II wurde der Eiweiß-N durch Fällung mit Kupferhydroxyd, in Portionen III und IV durch Fällung mit Bleiessig bestimmt. Die übrigen 4 Portionen wurden mit je 7 g Traubenzucker versetzt, 6 Tage bei 34° stehen gelassen, dann ebenfalls analysiert. Portionen V und VI wurden mit Kupferhydroxyd, Portionen VII und VIII mit Bleiessig gefällt.

<sup>1)</sup> Galeotti, Biochemische Zeitschrift, Bd. 53, S. 474 (1913).



	Portion	Fällungsmittel	Eiweiß-N in mg	Zunahme von Eiweiß-N in mg
Kontrolle	I	Kupferhydroxyd	14,2	—
	II	„	14,2	—
	III	Bleiessig	15,9	—
	IV	„	17,8	—
Versuch	V	Kupferhydroxyd	20,9	} 7,1
	VI	„	21,7	
	VII	Bleiessig	11,7	} —
	VIII	„	10,7	

Die Filtrate von dem Bleiniederschlage der Portionen VII und VIII wurden vereinigt, mit Schwefelwasserstoff entbleit, quantitativ filtriert und nachgewaschen im Filtrate der Schwefelwasserstoff durch Erhitzen vertrieben und alsdann die Lösung mit Kupferhydroxyd behandelt. Die N-Bestimmung im Kupferniederschlage ergab:  $N = 14,7$  mg; es ist also gerade diejenige Stickstoffmenge, welche die Zunahme des «Eiweißstickstoffs» der Kupferportionen ausmacht. Durch diesen Versuch wurde jedenfalls die Tatsache festgestellt, daß im Filtrate von dem Bleiniederschlag der nach Stutzer fällbare Stickstoff enthalten war.

#### Versuch 27.

4 Saftportionen zu je 30 ccm. Dieser Versuch bildet eine genaue Wiederholung vom Versuch 11, mit dem er auch gleichzeitig ausgeführt wurde. Den einzigen Unterschied bildete der Umstand, daß der «Eiweiß-N» nicht nach Stutzer, sondern durch Fällung mit Bleiessig bestimmt wurde.

I. Kontrolle a . . . .	Eiweiß-N = 29,0 mg
II. „ b . . . .	„ = 28,9 „
III. Versuch a . . . .	„ = 32,3 „
IV. „ b . . . .	„ = 32,3 „

In diesem Versuche wurde zwar auch nach der Bleiessigmethode eine Vermehrung des «Eiweißstickstoffs» wahrgenommen; sie war aber bedeutend geringer, als die nach

Stutzer ermittelte. Wir haben überhaupt auch in anderen Versuchen Zunahmen des «Eiweißstickstoffs» durch Fällung mit Bleiessig bestimmen können, bemerken aber ausdrücklich, daß die Resultate quantitativ nicht identisch sind mit den nach der Stutzerschen Methode erhaltenen Zahlen, und zwar ist diese Differenz nur nach erfolgten synthetischen Vorgängen zu verzeichnen, da beide Methoden sowohl für frischen, als für autolysierten Saft vollkommen gleiche Resultate liefern.

Es ist also ziemlich wahrscheinlich, daß die bei den synthetischen Vorgängen entstehenden Stoffe mit den Eiweißsubstanzen des frischen Saftes nicht identisch sind. Dieses Resultat ist jedoch nicht überraschend und kann nicht gegen die Anteilnahme der Endotryptase an den synthetischen Vorgängen sprechen. Obschon die Literatur über fermentative Synthesen noch gar nicht reich ist, wissen wir jedoch, daß z. B. durch Maltase nicht Maltose, sondern die sogenannte Isomaltose<sup>1)</sup> synthetisiert wird. Nach C. Hill<sup>2)</sup> handelt es sich hier sogar um mindestens zwei verschiedene Disaccharide. Auch bei der Umkehrung der Lactasewirkung soll die durch das Ferment nicht wieder hydrolysierbare Isolactose entstehen.<sup>3)</sup> Auf Grund dieser Ergebnisse glaubt selbst Armstrong<sup>4)</sup> annehmen zu dürfen, daß Fermente gerade diejenigen Stoffe synthetisieren, die sie nicht wieder spalten können.

In der Gruppe der proteolytischen Fermente wurden schon längst die kondensierenden Wirkungen von Pepsin, bezw. Labferment beschrieben. Die erhaltenen Kondensationsprodukte hat Sawjalow<sup>5)</sup> mit dem Namen Plasteine belegt. Die chemische Natur dieser Stoffe ist noch sehr lückenhaft untersucht worden. Nach den Angaben von Henriques und

<sup>1)</sup> Emmerling. Chemische Berichte, Bd. 34, S. 600 (1901).

<sup>2)</sup> C. Hill, Transact. Chem. Soc., Bd. 83, S. 578 (1903).

<sup>3)</sup> E. Fischer und Armstrong, Chem. Ber., Bd. 35, S. 3153 (1902).

<sup>4)</sup> Armstrong, Proceed. of the Royal Soc., Bd. 76, S. 592 (1905).

<sup>5)</sup> Sawjalow, Pflügers Archiv, Bd. 85, S. 171 (1910); diese Zeitschrift, Bd. 54, S. 119 (1907).

Gjaldbaek<sup>1)</sup> unterscheiden sich die Plasteine von den eigentlichen Eiweißen vor allem durch sehr geringen Stickstoffgehalt. Da nicht krystallinische Verbindungen, sondern die eiweißähnlichen Produkte der Pepsinspaltung als Material für die Plasteinbildung dienen, so ist es noch sehr fraglich, ob Plasteine in der Tat als einheitliche Stoffe anzusehen sind. Entgegen der neueren Behauptung von Glagolew<sup>2)</sup> glauben wir danach, daß die fermentative Synthese in diesem Falle nicht endgültig nachgewiesen ist. Aus eben demselben Grunde können wir die interessanten Ergebnisse von Robertson<sup>3)</sup> nicht als ausschlaggebend betrachten. Der genannte Forscher will die Bildung eines phosphorhaltigen Stoffes von der Natur der Plasteine beobachtet haben.

Durch all diese Auseinandersetzungen wollen wir durchaus nicht die große Wichtigkeit sämtlicher soeben erwähnten Untersuchungen über Plasteine in Abrede stellen; es ist jedoch einleuchtend, daß die weiteren Untersuchungen über diese Stoffe dadurch erschwert werden sollen, daß die chemische Natur des Ausgangsmaterials nicht bekannt ist. In dieser Hinsicht scheinen die proteolytischen Fermente der Pflanzen bessere Bedingungen zu gewähren, da der Eiweißabbau in Pflanzen meist ein vollkommener ist und also direkt bis zur Bildung der krystallinischen Produkte von bekannter Zusammensetzung fortschreitet. Da Albumosen und Peptone bei der Hefenautolyse nicht entstehen, so ist es kaum zweifelhaft, daß in unseren Versuchen die Aminosäuren oder die Purinderivate als Material zu synthetischen Vorgängen dienen. Die Abwesenheit der Albumosen und Peptone im autolysierten Macerationssaft wird dadurch dokumentiert, daß die Stickstoffbestimmungen in Kupferhydroxydfällung und in Bleiacetatfällung gleiche Werte ergaben.

Unsere weiteren Untersuchungen bezwecken die Aufklärung der chemischen Natur der im Macerationshefensaft synthetisierten Stoffe. Versuche darüber haben wir schon eingeleitet.

<sup>1)</sup> Henriques und Gjaldbaek, Diese Zeitschrift, Bd. 71, S. 485 (1911); Bd. 81, S. 439 (1912).

<sup>2)</sup> Glagolew, Biochem. Zeitschrift, Bd. 56, S. 125 (1913).

<sup>3)</sup> T. B. Robertson, Journal of Biol. Chemie, Bd. 3, S. 95 (1907) Bd. 5, S. 493; Bd. 8, S. 287; Bd. 9, S. 295; Bd. 12, S. 233.

### Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

1. Der Macerationshefensaft enthält immer eine beträchtliche Menge von Eiweißstoffen und die Endotryptase.

2. Bei 34° findet eine starke Autolyse des Preßsaftes statt. Die hydrolysierbaren Eiweißstoffe sind nach etwa 2 Tagen immer zerlegt; eine geringe, aber ganz konstante Eiweißmenge hinterbleibt jedoch selbst nach 9tägiger Autolyse.

3. Nach der Hydrolyse der Eiweißstoffe können synthetische Vorgänge im Saft eintreten. Notwendige Bedingungen für die Synthese sind: 1. ein hinreichender Eiweißzerfall und 2. eine hohe Zuckerkonzentration. Die Reaktion des Saftes scheint dagegen keine große Rolle zu spielen.

4. Nach erfolgten synthetischen Vorgängen findet eine Zunahme des nach der Stutzerschen Methode mit Kupferhydroxyd fällbaren Stickstoffs statt. In günstigen Fällen erreicht die Zunahme des «Proteinstickstoffs» 16% der im frischen Saft vor der Autolyse enthaltenen Menge. Bedeutend geringere Werte liefert die Fällung des «Proteinstickstoffs» mit Bleiessig. Die gebildeten Stoffe sind also mit den genuinen Eiweißstoffen des Hefensaftes nicht identisch.