

## Zur Kenntnis des Hefengummi.

Von

**H. Euler und A. Fodor.**

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. April 1911.)

Stellt man Präparate von Hefeninvertase dar, sei es durch Extraktion der getrockneten Zellen mit Wasser, sei es aus autolysierter Hefe, so enthält das enzymatisch wirksame Produkt reichliche Mengen eines Kohlenhydrates, welches Salkowski als Hefengummi bezeichnet hat. Die Invertasepräparate liefern nämlich mit Fehlingscher Lösung das von Salkowski beschriebene Kupfersalz des Gummi, das nach der Hydrolyse Mannosehydrason liefert. Aus sehr wirksamen Invertasepräparaten wurde Gummi von der spezifischen Drehung  $[\alpha]_D = 86^\circ$  dargestellt.

Nun haben es einerseits die im hiesigen Laboratorium angestellten Reinigungsversuche sehr unwahrscheinlich gemacht, daß die Invertase, wie früher fast durchweg angenommen wurde und jetzt noch vielfach angenommen wird, ein Eiweißkörper ist, denn nach der Behandlung der Präparate mit Kaolin und andern Adsorptionsmitteln für Eiweißstoffe bleibt ein Rest von hoher Aktivität zurück. Andererseits sind offenbar eine Reihe chemischer Reaktionen dem Hefengummi und der Invertase gemeinsam, und es wird hierdurch die Annahme nahegelegt, daß die Invertase selbst ein höheres Kohlenhydrat und also zum Hefengummi chemisch verwandt ist. Wir haben deshalb aus der gleichen Hefe, aus welcher hier die Invertase dargestellt wird, Hefengummi isoliert und versucht, an diesem Material unsere Kenntnisse über die Zusammensetzung des Hefengummi zu erweitern.

Frühere Ergebnisse: Nägeli und Loew<sup>1)</sup> haben den Hefengummi zuerst dargestellt. Später haben Wegner<sup>2)</sup> und Hessenland<sup>3)</sup> den Hefengummi untersucht, und letzterer hat bei der Hydrolyse seines Materials Mannose, Galaktose und Fruktose erhalten. Sein Gummi war offenbar ein Gemisch verschiedener Kohlenhydrate; und das Gleiche gilt von dem Material Lindets.<sup>4)</sup>

Bedeutend reiner war der von Oshima<sup>5)</sup> untersuchte Gummi, welcher indessen noch etwas Fukose enthielt; er war nach einer von Salkowski<sup>6)</sup> angegebenen Methode dargestellt worden, welche zweifellos den besten Gummi liefert, und welche die zuverlässigeren Resultate ermöglicht hat, die dieser Forscher, Oshima, und Meigen und Spreng<sup>7)</sup> erhalten haben.

Die Ergebnisse von Meigen und Spreng sind die folgenden:

«Bei der Hydrolyse des Hefengummis wird nur Mannose und Glukose gebildet, keine Galaktose und keine Pentosen. Der Gummi enthält doppelt so viel Mannose wie Glukose. Die Formel ist in Übereinstimmung mit dem Befund von Salkowski  $C_{12}H_{22}O_{14}$ . Die spezifische Drehung beträgt  $[\alpha]_D^{20} = 89,2^\circ - 89,6^\circ$ .

Diese Ergebnisse bestätigen — abgesehen von der Methylfuroreaktion — die Resultate Oshimas.

#### Darstellung des Hefegummis.

Wir haben den Gummi durch Auskochen der Hefe mit Wasser nach der Vorschrift von Nägeli und Loew erhalten und denselben nach Salkowski behandelt.

600 g getrocknete, durch Ausziehen mit Alkohol und Äther von Fett befreite Hefe wurde in einer Porzellanschale mit 4,5 l Wasser 12 Stunden extrahiert. Es wurde durch Falten-

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

2) Zeitschr. d. Vereins f. Rübenzuckerindustrie, Bd. XL, S. 789, 1890.

3) Zeitschr. d. Vereins f. Rübenzuckerindustrie, Bd. XLII, S. 671, 1892.

4) Comptes rendus de l'Acad. des Sc., Bd. CXII, S. 102, 1891.

5) Diese Zeitschr., Bd. XXXVI, S. 42, 1902.

6) Ber. d. d. chemischen Gesellsch., Bd. XXVII, S. 497 u. 925, 1894.

7) Diese Zeitschr., Bd. LV, S. 48, 1908.



filter filtriert und das Filtrat mit Bleiacetat gefällt. Das Blei wurde mit Schwefelwasserstoff entfernt und das Filtrat vom Schwefelblei im Vakuum eingedunstet. Da die Lösung sehr stark schäumt, eignet sich hierzu besonders ein heizbarer Vakuumexsikkator. Die eingedunstete Lösung wurde mit dem doppelten Volumen Alkohol gefällt. Nach 14—16 Stunden wurde die überstehende bräunliche Flüssigkeit abgossen, und der am Boden befindliche hellbraune Gummirückstand in 30—40 ccm Wasser gelöst, und mit Alkohol wieder gefällt. Diese Umfällung wurde dreimal wiederholt, zuletzt unter Abkühlung. Endlich wurde die Fällung mit Alkohol und Äther innig verrieben, abgesogen und getrocknet. Man erhält so ein feines gelbliches Pulver in einer Ausbeute von etwa 4 g.

Weit besser erwies sich die von Salkowski angegebene Darstellung aus autolysierter Hefe, insofern dabei ein reineres Produkt erhalten wurde. Das Verfahren ist kurz folgendes:

Der durch mehrwöchentliche Autolyse von Brauereihefe gewonnene Saft wurde durch 80—95%igen Alkohol gefällt. Der entstehende Sirup wurde von der Mutterlauge befreit, in möglichst wenig Wasser gelöst, und von einer geringen Menge weißer Krystallnadeln eines basischen Stoffes (Purinbase) abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Fehlingscher Lösung in der Kälte gefällt und die ausgeschiedene Kupferverbindung durch Auswaschen mit Wasser vom Alkali befreit.

Geschieht diese Fällung in der Kälte, so bleibt die Kupferverbindung teigig, bei Behandlung in der Hitze tritt Reduktion ein. Je weiter die Entfernung des Alkalis fortschreitet, desto leichter zerteilt sich der ursprüngliche Klumpen in kleine Teilchen, welche mit Wasser aufquellen und schließlich in Lösung gehen. Aus dieser blaugefärbten Lösung kann die Gummikupferverbindung sowohl durch Alkali als durch Alkohol wieder ausgefällt werden. Die mit Alkohol gefällte Substanz, welche im trocknen Zustande ein hellgraublaues Pulver bildet, konnte nicht in konstanter Zusammensetzung erhalten werden. Zwei Analysen ergaben Werte für Kupfer zwischen 3 und 5%. Angenähert entspricht dies einer Zusammensetzung von einem Atom Kupfer auf 7—8 Hexosereste. Indessen können diese

Werte entsteht sein durch die Hydrolyse der ursprünglichen Kupferverbindung, welche eine Anreicherung des Kupfers zur Folge haben muß. Es ist auch möglich, daß die Schwankung im Kupfergehalt durch Adsorption von kolloidalem Kupferhydroxyd bedingt ist.

Aus diesem Kupfersalz konnte durch Zersetzung mit sehr verdünnter Salzsäure eine klare Lösung gewonnen werden, aus welcher der Gummi mit Alkohol ausgefällt wurde. Nach zweimaliger Umfällung wurde die spezifische Drehung der Substanz wie folgt ermittelt: Die wässrige Lösung, von welcher 5 ccm nach dem Verdunsten einen Rückstand von 0,1541 g (bei 105° getrocknet) gaben, zeigte im 50 mm-Rohr eine Drehung  $\alpha = 1,16^\circ$ . Hieraus berechnet sich  $[\alpha]_D^{20} = 75,2$ .

Der so erhaltene Gummi zeigte nach einer nochmaligen Reinigung über die Kupferverbindung (Zersetzung mit Säure und 2-maligem Umfällen mit Alkohol)  $[\alpha]_D^{20} = 86,88$ . Nach einer weiteren Umfällung mit Alkohol ergab sich  $[\alpha]_D^{20} = 86,95$ .

Der aus der letzten Lösung abgeschiedene Gummi war ein schneeweißes leichtes Pulver.

Eine andere Reinigung wurde in der Weise durchgeführt, daß das Präparat, welches durch Auskochen von Hefe mit heißem Wasser und mehrmaliges Umfällen mit Alkohol gewonnen worden war, der Dialyse unterworfen wurde. Da die Lösungen sehr leicht von Bakterien angegriffen werden und der Diffusionsversuch drei Tage fortgesetzt wurde, so war eine energische Sterilisierung mit Chloroform notwendig.<sup>1)</sup>

Abgesehen von Salzen fanden wir in der Außenflüssigkeit auch Gummi (nachgewiesen durch die Kupferverbindung). Der bei der Dialyse zurückbleibende Gummi wurde mit Alkohol gefällt und das erhaltene und getrocknete Pulver teils zur Molekulargewichtsbestimmung, teils zur Messung der spezifischen Drehung benutzt.

Eine Lösung, von welcher 5 ccm beim Eindunsten einen Rückstand von 0,1687 g hinterließen, zeigte im 50 mm-Rohr

<sup>1)</sup> Mit Toluol konnte die Lösung nicht dauernd steril gehalten werden.



eine Drehung von  $\alpha = 1,48^\circ$ . Hieraus ergibt sich  $[\alpha]_D^{20} = 87,7^\circ$ . Ein anderer Versuch ergab:  $\alpha = 1,50$ , somit  $[\alpha] = 89,0$ .

Salkowski fand  $+ 90,1^\circ$ . Der Wert von Meigen und Spreng ist  $89,6^\circ$ .

Molekulargewichtsbestimmungen: 1,8005 g Substanz, getrocknet über Schwefelsäure bei 14 mm in einem auf dem Wasserbad erhitzten Exsikkator wurden zu 25 ccm gelöst. Diese 7,202%ige Lösung gab im Beckmannschen Apparat eine Gefrierpunktserniedrigung von 0,11. Ein großer Teil dieser Erniedrigung ist von Verunreinigungen hervorgerufen. Wie später ausgeführte, bald mitzuteilende Diffusionsversuche gezeigt haben, liegt das Molekulargewicht über 10000.

Die durch Dialyse gereinigte Gummilösung gibt weder mit Bleiacetat noch mit Phosphormolybdän- oder Phosphorwolframsäure eine Fällung. Die Abwesenheit von Eiweißkörpern wurde noch durch den negativen Ausfall der Biuretreaktion festgestellt. Kolloidales Eisen scheint nur in Anwesenheit von Elektrolyten eine Fällung zu erzeugen.

Über die quantitative Zusammensetzung des Hefengummi lagen bis jetzt nur die Angaben von Meigen und Spreng vor. Diese Forscher haben, wie erwähnt, die Abwesenheit von Galaktanen und Pentosanen festgestellt: ihr Befund über die relative Menge von Glukose und Mannose stützt sich auf die Bestimmung der relativen Menge von Mannosehydrazon und Glukosazon. Wir haben in folgender Weise versucht, einen sicheren Aufschluß über die quantitative Zusammensetzung des Gummi zu erhalten.<sup>1)</sup>

#### Quantitative Hydrolyse des Gummi.

Ein durch Autolyse gewonnener, über die Kupferverbindung gereinigter Gummi wurde in Wasser gelöst; die Konzentration

<sup>1)</sup> Zunächst haben wir uns davon überzeugt, daß bei der Hydrolyse des Gummi mit 10%iger Schwefelsäure keine organischen Säuren gebildet werden. Nach Neutralisation der hydrolysierten Lösung mit Barytlösung befanden sich in der vom Baryumsulfat abgetrennten Flüssigkeit keine Baryumsalze.

Die Angaben von Meigen und Spreng über die Abwesenheit von Pentosen können wir bestätigen.

dieser Lösung, auf Grund der spezifischen Drehung  $88,6^\circ$  war  $4,27\%$ . Von dieser Lösung wurden  $5\text{ cm}$  zur Trockne eingedampft und ergaben einen Rückstand von  $0,2201\text{ g}$ ; hieraus berechnet sich eine Konzentration von  $4,40\%$ ; der Gummi enthielt also noch ca.  $3\%$  Verunreinigungen. Demgemäß zeigt auch das in Lösung gebrachte Produkt eine  $3,9\%$  niedrigere spezifische Drehung, nämlich  $84,8^\circ$ . Die Verunreinigungen des angewandten Gummis sind also optisch inaktiv.  $75\text{ cm}$  dieser  $4,27\%$ igen Lösung, enthaltend  $3,2\%$  Gummi, wurden mit  $2\text{ cm}$  konzentrierter Schwefelsäure versetzt und am Wasserbad 10 Stunden lang erwärmt. Die so hydrolysierte Lösung wurde hierauf auf  $100\text{ cm}$  gebracht (Lösung L); derselben wurden  $5\text{ cm}$  entnommen; dieselben haben wir auf  $10\text{ cm}$  verdünnt und  $5\text{ cm}$  der verdünnten Lösung nach Bertrand<sup>2)</sup> reduziert. Verbraucht wurden  $7,44\text{ cm}$   $\frac{1}{4}$  norm.- $\text{KMnO}_4$ -Lösung, entspr.  $118,4\text{ mg Cu}$ , entspr.  $93,3\text{ mg Glukose}$ . Die gesamte Lösung L enthält daher  $3,73\text{ g}$  als Glukose berechnete Hexose. Für den Übergang von  $3,2\text{ g}$  Gummi in Hexose ergibt die Berechnung nach der Gleichung  $(60 \times 180 - 59 \times 18) : (60 \times 180) = 3,2 : x$  den Wert  $3,56\text{ g Glukose}$ .

Die Lösung L zeigte im  $100\text{ mm}$ -Rohr die optische Drehung  $\alpha = 1,14^\circ$  und  $1,22^\circ$ , welche im Mittel einer spezifischen Drehung von  $[\alpha]_D = 31,6^\circ$  entsprechen.

Endlich wurde auch der Mannosegehalt der Lösung L ermittelt.  $25\text{ cm}$  derselben (enthaltend  $0,932\text{ g}$  Hexosen) wurden neutralisiert und mit  $0,6\text{ g}$  Phenylhydrazin, in der dreifachen Menge Eisessig gelöst, versetzt. Das ausgeschiedene, völlig harzfreie Mannosehydrazon wurde mit Wasser ausgewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Dasselbe wog  $0,8189\text{ g}$  (inkl. einer Korrektur von  $0,02\text{ g}$  nach Bourquelot und Hérissey [Lippmann, Chem. der Zuckerarten, Bd. CXXIX, S. 339, 1904]). Auf Mannose umgerechnet  $0,5460\text{ g}$ . Der Gesamtzucker enthält daher  $58,5\%$  Mannose.

<sup>2)</sup> Bull. Soc. Chim., Bd. XXXV, S. 1285, 1906.



## Wiederholung.

Ausgangsprodukt war ein Gummi, aus welchem unter Annahme der spezifischen Drehung  $87,13^\circ$  eine 5,00%ige Lösung bereitet wurde (die Lösung zeigte im 50 mm-Rohr  $\alpha = 2,18^\circ$ ). 5 ccm dieser Lösung gaben 0,2992 g. bei  $105^\circ$  getrockneten Rückstand, welcher einer Konzentration von 5,98% entspricht und  $[\alpha]_D = 72,9^\circ$  ergibt. Auch in diesem Falle bedingt die im Gummi enthaltene optisch inaktive Verunreinigung (16,3%) eine vollständig proportionale Verminderung der spezifischen Drehung (16,5%).

75 ccm der 5%igen Gummilösung wurden in der gleichen Weise, wie oben, hydrolysiert und auf 100 ccm verdünnt. Nach 5 Stunden der Lösung entnommene 5 ccm zeigten, daß die Hydrolyse noch nicht beendet war, da mit Fehlingscher Lösung noch Gummikupferverbindung ausfiel. Der Rest von 95 ccm wurde daher noch weitere 5 Stunden am Wasserbade erwärmt und wieder auf 100 ccm gebracht; dieser Lösung (Lösung  $L_1$ ) wurden wieder 5 ccm entnommen, auf das doppelte Volumen gebracht und 5 ccm aus der so verdünnten Lösung, wie oben, nach Bertrand reduziert. Verbrauch wurden 7,98 ccm  $\frac{1}{4}$  norm.- $KMnO_4$  entspr. 3,928 g Glukose für 100 ccm Lösung  $L_1$ .

Die optische Drehung der Lösung  $L_1$  betrug im 100 mm-Rohr  $\alpha = 1,21^\circ$  und  $\alpha = 1,25^\circ$ . Hieraus läßt sich im Mittel für die in der Lösung  $L_1$  enthaltenen 3,928 g Hexosen die spezifische Drehung  $[\alpha]_D = 31,25$  berechnen.

Der Mannosegehalt wurde, wie oben, in 25 ccm der Lösung  $L_1$  bestimmt und 0,8400 g Mannosehydrazon gefunden, entspr. 0,56 g Mannose, somit 57,2% von der Gesamthexose (3,928 g).

Zur Sicherheit haben wir untersucht, ob Schwefelsäure von obigen Konzentrationen keine zerstörende Wirkung auf Mannose ausübt. Demzufolge wurde ca. 1 g Kahlbaumsche Mannose in 4,5%iger  $H_2SO_4$  aufgelöst und die Drehung vor und nach dem 5 stündigen Erhitzen am Wasserbade unter gutem Rückfluß ermittelt. Dieselbe betrug vor dem Erhitzen im 100 mm-Rohr  $0,47^\circ$  und nach dem Erhitzen  $0,49^\circ$ .

Die Lösung blieb beim Erwärmen vollständig farblos.

Schließlich haben wir uns davon überzeugt, daß Mannose von Glukose auf dem von uns eingeschlagenen Weg wirklich quantitativ getrennt werden kann:

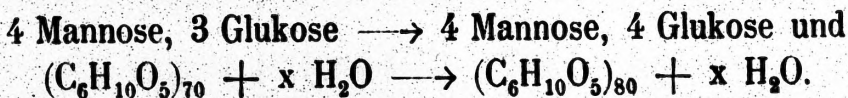
0,6601 g Mannose (bei 105° getrocknet) + 0,3200 g Glukose, in 25 ccm Wasser gelöst und mit 0,6 ccm Phenylhydrazin + 2,1 ccm Eisessig versetzt, lieferten 0,9890 g Mannosehydrazon (inkl. 0,02 g Korrektur für 50 ccm Lösung und Waschwasser); dies entspricht 0,6593 g Mannose. Die angewandte Trennungsmethode mit der Korrektur von Bourquetot und Hérisséey gibt also genaue Resultate.

### Zusammenfassung.

Wir können unsere Ergebnisse in folgender Tabelle zusammenstellen:

	Berechnet für			Gefunden
	Zusammensetzung nach Meigen und Spreng	40 Mannose + 30 Glukose - 69 H <sub>2</sub> O	40 Mannose + 40 Glukose - 79 H <sub>2</sub> O	
Spez. Drehung nach der Hydrolyse <sup>1)</sup>	28,6	30,24	32,96	31,6 und 31,25
Mannosegehalt	66,6 %	57,1 %	50 %	57,2% u. 58,5%

Auf Grund unserer Versuche nehmen wir folgende Grenzen für die Zusammensetzung des Hefegummis an:



<sup>1)</sup> Hierbei wurden die spezifischen Drehungen angenommen: Glukose 52° und Mannose 13,92° (Temp. = 20°).