

Über die Bestimmung des Glykogens in der Hefe.

Von

E. Salkowski.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. Juni 1914.)

Durch die kürzlich erschienene Arbeit von Hans Euler:¹⁾ «Über die Rolle des Glykogens bei der Gärung durch lebende Hefe» bin ich auf eine Methode zur Bestimmung des Glykogens in der Hefe von Schönfeld und Krampf aufmerksam geworden, die mir bisher entgangen war. Diese Methode ist nach dem Chem. Zentralbl. 1911, I., S. 1603 bezw. 1604²⁾ im wesentlichen in Anlehnung an das Pflügersche Verfahren folgende: 10 g Hefe werden mit 20 ccm 60%ige Kalilauge 3 Stunden im siedenden Wasserbad in einem Kölbchen erhitzt, der Kolbeninhalt mit 40 ccm Wasser in ein Becherglas gespült, 160 ccm 96%iger Alkohol hinzugegossen und über Nacht stehen gelassen. Die klare Flüssigkeit wird durch ein quantitatives Filter filtriert,³⁾ der Niederschlag mit 66%igem Alkohol gewaschen, die Flüssigkeit nach dem Absitzenlassen wieder dekantiert usw., bis das Filtrat farblos ist. Zuletzt wird zweimal mit absolutem Alkohol und zweimal mit Äther gewaschen. Dann löst man den Niederschlag in kochendem Wasser, filtriert durch Glaswolle, neutralisiert vorsichtig mit Salzsäure, bis Flocken ausfallen, füllt auf 400 ccm auf und filtriert. 200 ccm des Filtrats versetzt man mit 10 ccm Salzsäure von 1,19 D⁴⁾ und invertiert durch 3stündiges Erhitzen im Wasserbad usw.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 337 (1914).

²⁾ Das Original in der Wochenschrift für Brauerei ist mir nicht zugänglich.

³⁾ Der Zweck dieser Operation ist nicht recht ersichtlich, da von einer Benutzung des auf dem Filter Gesammelten nachher nicht die Rede ist.

⁴⁾ Also Gehalt der Flüssigkeit an HCl = ca 2,3%.

In Gemeinschaft mit Künzel ist Schönfeld noch einmal auf das Verfahren zurückgekommen. Soweit sich aus dem Referat im Chem. Zentralbl, 1914, I., S. 578 ersehen läßt,¹⁾ ist das Verfahren ganz dasselbe, nur die Mengenverhältnisse etwas andere.

Euler hat bei seinen Glykogenbestimmungen in der Hefe das erstere Verfahren²⁾ mit kleinen Modifikationen befolgt. Euler sagt von demselben:

«Die Glykogenbestimmung in der Hefe ist in neuester Zeit von Schönfeld und Krampf in ausgezeichneter Weise ausgearbeitet worden auf Grund der Pflügerschen Methode. Das Verfahren dieser Forscher ist zweifellos für Hefeuntersuchung das genaueste und geeignetste.»

Diesem Urteil kann ich allerdings durchaus nicht beistimmen; ich würde in dem Verfahren, selbst wenn es richtig wäre — was es leider nicht ist —, nur eine einfache Übertragung des Pflügerschen Verfahrens von der Leber bezw. anderen tierischen Organen auf die Hefe sehen, ohne Berücksichtigung der etwa in der Natur des Untersuchungsmaterials liegenden Besonderheiten. Daß die Verfasser dies unbegreiflicherweise unterlassen haben, ist für das Verfahren verhängnisvoll geworden. Übrigens wüßte ich nicht, daß man unter Methoden zur Glykogenbestimmung in der Hefe die Auswahl hätte. Mir ist wenigstens nur noch das mehr indirekte Verfahren von Buchner und Mitscherlich³⁾ bekannt, bei welchem aus dem Fehlen der Selbstgärung der noch gärungstüchtigen Hefe auf die Abwesenheit von Glykogen in derselben geschlossen wird, bezw. aus der Verminderung der Selbstgärung auf Abnahme des Glykogens. Allerdings mögen in der betreffenden Fachliteratur, die mir naturgemäß ferner liegt, noch Annäherungsverfahren beschrieben sein.

¹⁾ Das Referat ist nicht ganz so ausführlich wie das über die erste Mitteilung. Das Orig., Zeitschr. für Brauerei, Bd. 31, war mir nicht zugänglich.

²⁾ In seiner zweiten Mitteilung in dieser Zeitschrift, Bd. 90, S. 359 (1914), erwähnt Euler auch die Publikation von Schönfeld und Künzel, vermutlich ist ihm diese erst später zur Kenntnis gelangt.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 554.

Die Modifikationen, die Euler bei dem Verfahren von Schönfeld und Krampf angebracht hat, sind folgende:

1. Euler nimmt auf 10 g Hefe nicht 20 ccm 60%ige Kalilauge,¹⁾ sondern 30 ccm, was augenscheinlich zweckmäßig und von mir auch befolgt ist.

2. E. hat, wie es scheint, nicht die wässrige Lösung des Alkoholniederschlages auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt, filtriert und von dem Filtrat einen aliquoten Teil zur Hydrolyse verwendet, sondern erst filtriert, dann auf ein bestimmtes Volumen gebracht, wenigstens scheint mir das aus dem Wortlaut: «das reine Glykogen wird in heißem Wasser gelöst, filtriert und die Lösung mit Salzsäure neutralisiert. Nachdem man die Lösung auf ein bestimmtes Volumen gebracht hat, versetzt man etwa $\frac{1}{10}$ von der Lösung mit starker Salzsäure usw.» hervorzugehen. Da beim Filtrieren notwendig ein Teil verloren geht, so würde dieses Vorgehen einen Fehler bedingen, wenn man nicht annehmen will, daß bei der ersten Filtration nachgewaschen ist, was freilich einigermaßen genau nicht möglich ist, ohne das Volumen in unzulässiger Weise zu vergrößern, auch von Euler nicht erwähnt ist. Ganz klar geht übrigens aus dem Wortlaut der Beschreibung von Schönfeld und Krampf — wenigstens in dem Referat im Zentralblatt — auch nicht hervor, daß sie diesen Fehler vermieden haben. Schönfeld und Krampf haben übrigens nach dem Neutralisieren mit Salzsäure nochmals filtriert, bei Euler ist hiervon nichts erwähnt. Bei meinen Nachprüfungen bin ich anfangs ebenso verfahren wie Euler, um ja nicht einer Abweichung bezichtigt zu werden. Außerdem konnte ich so verfahren, da es mir nicht auf genaue Bestimmungen, sondern auf Prüfung des Prinzips ankam.

Es ist nun höchst auffallend, daß keiner der genannten Autoren, weder Schönfeld und Krampf, noch Künzel, noch auch Euler dabei das Hefegummi berücksichtigt hat. Das Hefegummi wird durch Kalilauge aus der Hefe ausgezogen, durch Alkohol aus der Lösung gefällt, ist in Wasser löslich und wird durch Salzsäure hydrolysiert (in ein Gemisch von Mannose und Dextrose übergeführt), verhält sich also bei der schließlichen Bestimmung des Reduktionsvermögens ganz so wie das sogenannte Hefeglykogen. Das Verfahren wäre also nur dann nicht von vornherein unrichtig, wenn das Hefegummi durch 3stündiges Erhitzen mit 60%iger Kalilauge zerstört wird. Das haben die Autoren nicht geprüft, und um diese Frage handelte es sich bei meinen Versuchen in erster Linie. Zum

¹⁾ Hierunter verstehe ich eine Lösung von 60 g KOH, aufgefüllt zu einem Volumen von 100 ccm.

Nachweis des Hefegummis bediente ich mich des Verfahrens der Ausfällung mit Fehlingscher Lösung + Natronlauge, das ich früher angegeben¹⁾ und bei der Untersuchung über die Natur des Invertins²⁾ genau beschrieben habe. Ich berichte zunächst über diese Versuche. Als Material benutzte ich einerseits amyllumfreie Preßhefe des Handels, anderseits 2 Hefen aus dem hiesigen Institut für Gärungsgewerbe.

Versuch I (Preßhefe).

10 g Preßhefe wurden 3 Stunden mit 30 ccm 60^o/₁₀iger Kalilauge im Wasserbad (in dieses versenkt) erhitzt, dann so verfahren, wie Schönfeld und Krampf bzw. Euler angeben. Zu der filtrierten alkalisierten Lösung³⁾ des durch Alkohol erhaltenen Niederschlags wurden 25—30 ccm Fehlingsche Lösung hinzugesetzt und in einem Becherglas im Wasserbad erhitzt. Es setzte sich bald ein zusammenhängender Niederschlag der Gummikupferverbindung ab, von dem sich die Flüssigkeit, abgesehen von einigen minimalen Flöckchen, abgießen ließ. Der zurückbleibende Niederschlag wurde einmal mit wenig Wasser abgespült, das zur Hauptmenge des Abgossenen gelangte, dann durch Aufgießen einiger Tropfen Salzsäure gelöst und durch Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde am nächsten Tage unter Vermeidung der an den Wänden des Becherglases befindlichen Chlorkaliumkrystalle auf einem gewogenen Filter abfiltriert, mit Alkohol, dann mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen, bei 115^o getrocknet. Es wurden 0,342 g Gummi = 3,42^o/₁₀ der frischen Hefe als lockeres schneeweißes Pulver erhalten. Eine minimale Quantität desselben zeigte das typische Verhalten zu Fehlingscher Lösung + Natronlauge, gab anderseits mit Essigsäure angesäuert absolut keine Jodreaktion.

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 27, S. 499 (1894). Die Fällbarkeit des Gummis durch Fehlingsche Lösung haben Naegeli und Loew schon beobachtet. Liebigs Annalen, Bd. 193, S. 322 (1878).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 31, S. 309 (1900/1901).

³⁾ Der Rückstand auf dem Filter wurde gewaschen, abgespritzt und unter Wasser aufbewahrt.

Da die entfernte Möglichkeit vorlag, daß die Gegenwart von Gummi die Jodreaktion stört, wurde der Rest des erhaltenen Gummis = 0,300 g und 0,015 g Leberglykogen zu 10 ccm gelöst.¹⁾ Die opalescente Lösung gab starke Jodreaktion; auch nach 5facher Verdünnung war diese noch sehr deutlich.

Versuch II (Preßhefe).

Zu dem Versuch diente dieselbe Hefe, die inzwischen vor Verdunstung geschützt, 2 Tage lang im Eisschrank aufbewahrt war. Die Verarbeitung war dieselbe, nur mit dem Unterschied, daß das Erhitzen im Wasserbad statt 3 Stunden 4 Stunden dauerte. Es wurden erhalten 0,345 g Gummi, wie stets als schneeweißes lockeres Pulver. Da die Möglichkeit einer Verunreinigung mit Chlorkalium vorlag, wurde es verascht. Die Asche betrug 0,021 g, das Reingummi also 0,324 g = 3,24% der frischen Hefe.²⁾

Versuch III (Preßhefe).

Um zu sehen, ob vielleicht doch bei dem langdauernden Erhitzen mit 60%iger Kalilauge Gummi zerstört wird, wurde ein vergleichender Versuch mit derselben Hefe unter Anwendung schwächerer Lauge angestellt. 20 g derselben Preßhefe wurden so bearbeitet, wie ich es in einem Versuch beschrieben habe, der eine besonders große Ausbeute an Hefegummi ergeben hatte,³⁾ nämlich mit 360 g Wasser und 40 ccm Natronlauge von 1,34 D einige Zeit gekocht, nach dem Erkalten auf 500 ccm aufgefüllt, am nächsten Tage die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit abgehebert und filtriert. 200 ccm des alkalischen Filtrats gaben 0,2757 Gummi = 3,45%. Die

¹⁾ Das Hefegummi löste sich, da es zum Zweck der quantitativen Bestimmung auf 115° erhitzt war, nicht vollständig.

²⁾ In diesen beiden Versuchen wurde der Alkohol von der Fällung der alkalischen Hefelösung verdunstet und der Rückstand mit negativem Resultat auf Zucker untersucht. Der Rückstand bestand im wesentlichen aus Seifen.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 69, S. 470.

Quantität des Gummis ist somit bei diesem schonenden Verfahren nicht merklich höher gefunden, als bei dem 3stündigen Erhitzen mit 60%iger Kalilauge. Es wird dabei also kein Gummi zerstört.

Versuch IV (Hefe U des Instituts für Gärungsgewerbe).

10 g in derselben Weise behandelt, jedoch die Lösung des Alkoholniederschlages auf 200 ccm gebracht, filtriert. 150 ccm des Filtrats geben 0,100 g Gummi = 1,33%.

Versuch V, Hefe R XII desselben Instituts.¹⁾

Die Lösung des Alkoholniederschlages auf 100 ccm gebracht, filtriert. 80 ccm geben 0,253 g Gummi = 3,163%.

Ich möchte hier eine Bemerkung über die Quantität des aus Presshefe von durchschnittlich 28–29% Trockengehalt erhaltenen Gummis einschalten. In der erwähnten Mitteilung in den Berichten d. Deutsch. chem. Ges. gab ich die Quantität desselben auf 2% an, dagegen ergab der in Bd. 69, S. 470, beschriebene Versuch 5,39%. Bei der Verarbeitung der großen Quantität Hefe, auf welche sich die erste Angabe bezieht, könnte man vermuten, daß die Extraktion des Gummis vielleicht nicht ganz vollständig war. Die jetzt vorliegenden Versuche mit 10 resp. 20 g Hefe zeigen indessen, daß die Quantität des Gummis sehr wechselnd ist.

Das angebliche Glykogen besteht also zu einem großen Teil aus Hefegummi und muß bei dem weiteren Gang der Analyse als Glykogen erscheinen, falls Hefegummi bei dreistündigem Erhitzen im Wasserbad mit verdünnter Salzsäure von ca. 2,2% HCl, wie es Pflüger für das Glykogen vorschreibt, hydrolysiert wird.

Es fragte sich nun, ob das in der Tat der Fall ist. Hierüber wurden folgende Versuche angestellt.

1. 0,3370 g lufttrockenes Hefegummi aus frischer Brauereihefe, noch von meinen früheren Versuchen über die Kohlenhydrate der Hefe stammend, wurden im Bechergläschen in 92 ccm Wasser unter Erwärmen gelöst.²⁾ Die Lösung war absolut klar und farblos. Nach Zusatz von 8 ccm Salzsäure

¹⁾ Diese beiden Hefen konnten aus äußeren Gründen nicht sofort verarbeitet werden, sondern erst nach etwa 14tägiger Aufbewahrung in fest verschlossenen Blechbüchsen in einem Kühlraum, dessen Temperatur konstant + 2° ist.

²⁾ Das Gummi wurde auf das Wasser aufgestreut.

von 1,126 D wurde das Bechergläschen in ein heißes Wasserbad versenkt und mit aufgelegtem Uhrglas 3 Stunden erhitzt, das Wasser dabei in starkem Sieden erhalten. Die Lösung hatte nach dieser Zeit einen kaum bemerkbaren gelblichen Ton angenommen, ihr Volumen etwas abgenommen. Sie wurde in ein Meßkölbchen von 100 ccm gebracht und mit dem Spülwasser des Meßkölbchens (einigemal gespült) auf 100 ccm aufgefüllt, gut durchgemischt, eine abgenommene Probe auf Gummi geprüft (Natronlauge + Fehlingsche Lösung): es war keins nachweisbar.

a) 25 ccm der Lösung wurden mit Na_2CO_3 neutralisiert, mit 60 ccm Fehlingscher Lösung und ebensoviel Wasser 2 bis 3 Minuten in gelindem Sieden erhalten, das Cu_2O auf einem gewogenen Filter gesammelt. Erhalten: $0,163 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,1447 \text{ Cu} = 0,0739 \text{ g Glukose}$.

b) 25 ccm ebenso behandelt. Erhalten: $0,1634 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,1450 \text{ Cu} = 0,0739 \text{ g Glukose}$.

Die Übereinstimmung ist zufällig eine ganz genaue. Danach sind aus 0,3370 g Gummi 0,2956 g Glukose erhalten.

Es fragt sich nun, wie viel Glukose die angewendete Quantität Gummi bei vollständiger Hydrolyse hätte liefern müssen: dazu war der H_2O -Gehalt des angewendeten Gummis zu bestimmen.

0,4572 g Gummi verloren bei 115° 0,0622 g H_2O , der Trockenrückstand betrug also 0,3950, die angewendeten 0,3370 g Gummi entsprechen also 0,2911 g Trockengummi. Diese hätten, wenn man für das Hefegummi die Formel $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ¹⁾ zugrunde legt, bei vollständiger Hydrolyse $\frac{0,2911 \times 360}{342} = 0,3065 \text{ g Glukose}$ liefern müssen.

Die Übereinstimmung ist, wie man sieht, eine sehr nahe. Für das geringe Minus kommt in Betracht, daß die Mannose, die nach den übereinstimmenden Angaben von Meigen und

¹⁾ Vgl. meine Mitteilung in den Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 27, S. 499 (1894), sowie Meigen und Spreng, Diese Zeitschrift, Bd. 55, S. 48 (1908) und H. Euler und Fodor, Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 338 (1911).

Spreng, mir und Euler und Fodor aus einem Teil des Hefegummi entsteht, nach den Untersuchungen von Herzog und Hörth¹⁾ ein etwas geringeres Reduktionsvermögen hat als die Glukose.

2. 0,3514 g lufttrockenes Gummi aus Preßhefe ebenso behandelt.

25 ccm geben $0,1746 \text{ g Cu}_2\text{O} = 0,1550 \text{ g Cu} = 0,0791 \text{ g Glukose} \times 4 = 0,3164 \text{ g Glukose}$.

Eine genaue Berechnung glaubte ich entbehren zu können, der H_2O -Gehalt wurde daher nicht bestimmt.

Es steht also fest, daß unter den eingehaltenen Bedingungen das Hefegummi ebenso wie das Glykogen hydrolysiert wird, somit nach der Berechnung aus Glukose als Glykogen erscheint, wenn auch unter Zugrundelegung des Faktors von Pflüger die Quantität des scheinbaren Glykogens etwas geringer ausfällt.

Daß bei einem derartigen Fehler die Glykogenbestimmung nach den genannten Autoren unbrauchbar ist, liegt auf der Hand.

Ich komme nun zu der Frage, ob nicht trotzdem vielleicht die Glykogenbestimmung ausführbar sei. Man brauchte ja nur das alkoholische Dekantat bzw. Filtrat von der Gummi-kupferverbindung nach dem Ansäuern mit Salzsäure mit H_2S zu entkupfern und das vorhandene Glykogen durch Erhitzen mit Salzsäure in Glukose überzuführen.

Dies geschah in Versuch I und II.

Die vom Gummi abgegossene kupferhaltige alkoholische Lösung wurde mit Salzsäure angesäuert und das Kupfer durch einen starken Strom von H_2S , während der Kolben dauernd auf dem Wasserbad stand, entfernt. Es gelang leicht, ein völlig klares und kupferfreies Filtrat und Waschwasser zu erhalten. Filtrat + Waschwasser wurden konzentriert, die Lösung unter Zusatz von 10 ccm Salzsäure auf 75 ccm gebracht, einige Minuten auf dem Drahtnetz in starkem Sieden gehalten,²⁾ nach dem Erkalten wieder auf 75 ccm aufgefüllt. 25 ccm gaben

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 60, S. 154 (1909).

²⁾ Da es sich nur um orientierende Versuche handelte, hielt ich dieses Verfahren für ausreichend.

in 2 Bestimmungen 0,0885 bzw. 0,0878 g, im Mittel 0,08815 g $\text{Cu}_2\text{O} = 0,0786 \text{ g} = 0,0398 \text{ g Glukose} \times 3 = 0,1194 \text{ g}$.

Im Versuch II wurde ebenso verfahren, jedoch die erhaltene kupferfreie Lösung neutralisiert, mit 8 ccm Salzsäure von 1,126 D auf 100 ccm gebracht und 3 Stunden im Wasserbad erhitzt, nach dem Erhitzen das Volumen von 100 ccm wieder hergestellt.

25 ccm gaben 0,0786 bzw. 0,075 g Cu_2O , im Mittel 0,0768 g $\text{Cu}_2\text{O} = 0,0682 \text{ g Cu} = 0,0348 \text{ g Glukose} \times 4 = 0,1392 \text{ g}$.¹⁾

Weitere Versuche in dieser Richtung habe ich unterlassen, da mir sehr bald ein Bedenken bezüglich des Prinzips auch dieses so abgeänderten Verfahrens aufstieg. Ich habe früher angegeben,²⁾ daß Hefecellulose — darunter verstehe ich den von Gummi, Eiweiß und Fett usw. befreiten Heferückstand — sich beim Erhitzen mit Wasser bei 2—2½ Atm. Druck sich in 2 Körper spaltet, ein in Wasser lösliches, durch Alkohol fällbares Kohlenhydrat und ein in Wasser unlösliches. Das erstere gibt in wässriger Lösung intensive Jodreaktion, wie das Glykogen, ebenso wie das ja die Hefecellulose selbst auch tut, das unlösliche bleibt auf Zusatz von Jodjodkalium ungefärbt. Nach diesen Eigenschaften habe ich das erstere Kohlenhydrat Erythrocellulose genannt, das zweite Achroocellulose.³⁾ Sollte diese Spaltung nicht auch — wenigstens partiell — beim Erhitzen mit 60%iger Kalilauge stattfinden?

In dieser Idee hatte ich gleich in Versuch I die bei der Filtration der wässrigen Lösung des Alkoholniederschlages auf dem Filter gebliebene schleimige Masse bis zum völligen Verschwinden der alkalischen Reaktion im Filtrat auf dem Filter mit Wasser gewaschen. Eine kleine Probe davon im Uhrglas mit Jodjodkaliumlösung übergossen, färbte sich leb-

¹⁾ Über die Ursache der Differenz der an derselben Hefe ausgeführten Bestimmungen in Versuch I und II siehe weiter unten.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 27, S. 3325 (1894).

³⁾ Nach Analogie des Achroodextrins. — Über das Verhältnis der Erythrocellulose zu dem Dextran von Meigen und Spreng siehe weiter unten.

haft braunrot. — Von diesem Niederschlag, der, wie oben bereits erwähnt, unter Wasser aufbewahrt war, wurde das überstehende Wasser soweit abgossen, daß das Volumen ungefähr 30 ccm betrug, 18 g Kalihydrat hinzugegeben¹⁾ und die Mischung 3 Stunden im Wasserbad erhitzt, mit 200 ccm Alkohol gefällt, am nächsten Tage von dem firnißartigen, fest am Glase haftenden Niederschlage abgossen, mit Alkohol und Äther nachgespült, der Niederschlag in Wasser gelöst, die Lösung zu 40 ccm ergänzt, filtriert. Eine kleine Probe wurde mit Essigsäure schwach angesäuert und mit Jodlösung geprüft: starke Glykogenreaktion. 30 ccm mit 2,5 ccm Salzsäure von 1,126 D im Kölbchen auf dem Drahtnetz ca. 10 Minuten in schwachem Sieden gehalten, dann neutralisiert und mit Fehlingscher Lösung erhitzt.

Erhalten $0,1776 \text{ g Cu}_2\text{O} = 0,1577 \text{ g Cu} = 0,0807 \text{ g Glukose} \times \frac{4}{3} = 0,1076 \text{ g Glukose}$.

Der bei der Filtration der Lösung des Alkoholniederschlages erhaltene Rückstand wurde nochmals ebenso behandelt.

Erhalten $0,0416 \text{ g Cu}_2\text{O} = 0,036 \text{ g Cu} = 0,0194 \text{ g Glukose} \times \frac{4}{3} = 0,0259 \text{ g Glukose}$.

Im ganzen wurde also in Versuch I aus 10 g käuflicher Preßhefe erhalten:

- | | | |
|----|---------------------------------------|------------------|
| 1. | bei dem ersten Erhitzen mit Kalilauge | 0,1212 g Glukose |
| 2. | » » zweiten » » » | 0,1076 » » |
| 3. | » » dritten » » » | 0,0259 » » |

zusammen 0,2547 g Glukose.

Dies entspricht unter Zugrundelegung des Pflüger-Nerkingschen Faktors für die Umrechnung von Glukose in Glykogen (0,927) 0,2361 g Glykogen. Rechnet man hiezu das erhaltene Hefegummi, das ja nach dem Verfahren der genannten Autoren als Glykogen erscheinen mußte = 0,342 g,²⁾

¹⁾ Das ist zwar nicht genau dasselbe wie das Erhitzen der Hefe mit 60%iger Kalilauge, aber doch annähernd, soweit es sich eben erreichen läßt.

²⁾ Genau genommen müßte man dieses erst auf Traubenzucker umrechnen und aus dieser Zahl durch Multiplikation mit 0,927 das Glykogen berechnen. Die Zahl für dieses würde dann etwas niedriger ausfallen; ich hielt es nicht für der Mühe wert, diese Umrechnung, die nebenher etwas anfechtbar ist, vorzunehmen.

so gelangt man zu 0,5786 g scheinbarem Glykogen = 5,78% der frischen Preßhefe = ca. 19% der Trockenhefe.

Euler spricht allerdings von einem mittleren Glykogengehalt der von ihm untersuchten Hefe von 10%, doch bezieht sich diese Zahl wohl auf die Trockensubstanz. Eine Angabe darüber fehlt zwar, doch kann die gleichzeitig mitgeteilte Zahl für P_2O_5 = 4,1% sich nur auf Trockensubstanz beziehen. Gleichzeitig heißt es an derselben Stelle: «Der Gesamtstickstoffgehalt betrug 61%». Es soll vermutlich heißen: der Gesamtgehalt an Stickstoffsubstanz (Stickstoff \times 6,25); auch diese Zahl zeigt, daß Trockenhefe gemeint ist.¹⁾

Ich komme also zu dem Resultat, daß eine Glykogenbestimmung in der Hefe nach dem Verfahren der Autoren, auch wenn man das Hefegummi beseitigt, unmöglich ist, weil das Glykogen durch Auflösung eines Teils der Zellmembran in der heißen Kalilauge einen ganz unberechenbaren Zuwachs einer Substanz erfährt, die sich genau wie Glykogen verhält und als solches mitbestimmt wird.

Sehr instruktiv ist bezüglich der Abhängigkeit des scheinbaren Glykogens von der Zeitdauer des Erhitzens der Versuch II, der an derselben Preßhefe angestellt ist wie Versuch I. Während in Versuch I bei 3stündigem Erhitzen mit Kalilauge aus 10 g der Hefe 0,1212 g Traubenzucker erhalten wurde, betrug dieser Wert beim Versuch II bei 4stündigem Erhitzen 0,1411, es war eben mehr von der Zellmembran in Lösung gegangen.

Um aber jeden Zweifel an der Richtigkeit meiner Deutung auszuschließen, stellte ich folgenden Versuch an:

1 g lufttrockene, von meinen früheren Versuchen über die Kohlenhydrate der Hefe herrührende Hefecellulose (was ich darunter verstehe, habe ich oben angegeben) wurde 3 Stunden mit 60%iger Kalilauge im Wasserbad erhitzt, mit Wasser verdünnt, mit Alkohol gefällt usw., der Niederschlag in heißem

¹⁾ In 100 g Trockensubstanz aus Preßhefe wurde hier gefunden 8,12% N (\times 6,25 = 50,75% Stickstoffsubstanz) und 4,41% P_2O_5 (durch Schmelzen mit Salpetermischung).

Wasser gelöst, abgekühlt, die Lösung auf 100 ccm gebracht und filtriert.

Proben der Lösung erwiesen sich frei von Gummi, gaben mit Essigsäure angesäuert intensive Jodreaktion.

1. 50 ccm des Filtrats wurden mit 5 ccm Salzsäure von 1,126 D angesäuert, einige Minuten auf dem Drahtnetz gekocht, das Volumen nach dem Abkühlen wieder auf 50 ccm gebracht. 25 ccm gaben nach dem Neutralisieren mit Fehling'scher Lösung erhitzt $0,1308 \text{ g Cu}_2\text{O} = 0,1161 \text{ g Cu} = 0,0591 \text{ g Glukose} \times 4 = 0,2364 \text{ g Glukose}$.

2. 20 ccm mit 20 ccm Salzsäure von 1,126 D gemischt, $1\frac{1}{2}$ Minuten in gelindem Sieden erhalten, dann neutralisiert usw., gaben $0,1168 \text{ g Cu}_2\text{O} = 0,1036 \text{ g Cu} = 0,0529 \text{ g Glukose} \times 5 = 0,2645 \text{ g Glukose}$ für die ganze Quantität.

Die Cellulose liefert also, ebenso behandelt wie die Hefe, scheinbares Glykogen, eine getrennte Bestimmung des Glykogens in der Hefe ist unmöglich.

Gibt es überhaupt ein Hefeglykogen? oder ist der Körper, den man dafür hält, nur ein in Lösung befindlicher Anteil der Zellmembran? Noch hat niemand einen gummifreien Körper isoliert, der andere Eigenschaften hatte, als der von mir beschriebenen glykogenähnliche aus der Hefecellulose abstammende.

Schon in meiner Mitteilung über die Kohlenhydrate der Hefe vor 20 Jahren sagte ich:

«Es ist wohl möglich, daß dasselbe (nämlich der die Jodreaktion gebende Körper, den ich Erythrocellulose genannt habe) in der Hefezelle in gelöster Form existiert, sei es als Vorstufe bei der Bildung von Cellulose, sei es umgekehrt als Umwandlungsprodukt. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß dieser Körper eine ähnliche Funktion hat, wie das Glykogen im Tierkörper.»

Ich bin noch heute dieser Ansicht. Ob man nun diesen Körper Glykogen nennt — oder Hefeglykogen, um einen gewissen Unterschied von dem Glykogen des Tierkörpers zuzulassen — oder gelöste Erythrocellulose oder Erythrodextrin, ist im Grunde gleichgültig, jedenfalls ist es nicht möglich, Glykogen zu isolieren, ohne diesen Körper mitzuerhalten, und es

gibt keine Grenze zwischen ihm und dem Glykogen, wenn dieses existiert, bei der quantitativen Bestimmung.

Diese Anschauung hat nun verschiedene Konsequenzen. Um mich in dieser Beziehung verständlich zu machen, muß ich etwas weiter ausholen.

In meiner Arbeit: «Über Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe»¹⁾ habe ich nachgewiesen, daß die Hefe ein Ferment enthält, welches ein Kohlenhydrat der Hefe in gärungsfähigen Zucker überführt. Ich bezeichnete diesen Vorgang als erste Etappe der Selbstgärung der Hefe. Den Zucker habe ich damals irrtümlich für Lävulose oder, wie man jetzt sagen würde, d-Fruktose gehalten, wenn ich auch diese Ansicht mit einer gewissen Reserve aussprach. Später überzeugte ich mich, daß die Linksdrehung der erhaltenen Lösungen von Verunreinigungen, insbesondere wohl von linksdrehendem Leucin herrührte, und daß der Zucker nicht Fruktose, sondern Dextrose ist.²⁾ Als Muttersubstanz des Zuckers glaubte ich mit Wahrscheinlichkeit das Hefegummi annehmen zu können, habe später aber gefunden, daß das Hefegummi an der Zuckerbildung nicht beteiligt ist.³⁾

Wenn nun die von mir so genannte Erythrocellulose in der Tat die Muttersubstanz der bei der Digestion der Hefe mit Chloroformwasser gebildeten Glukose ist, so darf der bei erschöpfender Autolyse bleibende Rückstand keine Erythrocellulose mehr enthalten. Das scheint in der Tat der Fall zu sein, wenigstens soweit man aus der nunmehr fehlenden Jodreaktion einen Schluß machen kann. Die weitere Untersuchung steht noch aus.

Schließlich noch ein Wort über die von mir gewählte Bezeichnung «Erythrocellulose». Meigen und Spreng haben dieselbe Substanz in Händen gehabt und sie Dextran genannt, weil sie bei der Hydrolyse nur Traubenzucker liefert. Diese Benennung ist nach den Versuchen der genannten Autoren ja vollkommen berechtigt, nur kommt bei dieser Bezeichnung nicht die wesentliche Eigenschaft dieser Substanz zum Aus-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 13, S. 506 (1889).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 54, S. 403 (1907/08).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 69, S. 466 (1910).

druck, die sie von anderen Dextranen unterscheidet, die Reaktion mit Jodlösung, man könnte den Körper vielleicht Erythrodextran nennen.

Gegen meine Vermutung, daß dieser Körper bezw. die lösliche Form desselben das sogenannte Glykogen der Hefe sein könne, wenden Meigen und Spreng ein, daß die Rechtsdrehung desselben viel geringer sei, als die des Leberglykogens, aber es ist ja nicht gesagt, daß das sogenannte Hefeglykogen mit dem Leberglykogen identisch sein muß! Es handelt sich nur darum, ob die an der Hefe beobachteten Erscheinungen, die man auf Glykogen bezieht, sich auf den in Rede stehenden Körper zurückführen lassen. Diese Frage ist meiner Meinung nach zu bejahen. Sind doch auch Meigen und Spreng bei ihren Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Hefe auf kein Glykogen gestoßen!

Ich sehe also keinen Grund, einen noch unbekanntem, von niemand tatsächlich dargestellten, nur supponierten Körper in der Hefe anzunehmen.

Auf die Kohlenhydrate der Hefe und einige damit zusammenhängende Fragen gedenke ich noch einmal zurückzukommen.
