

Über das Invertin (Invertase) der Hefe.

II. Mitteilung.

Von

E. Salkowski.

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

(Der Redaktion zugegangen am 29. Juni 1909.)

Am Schlusse meiner vor einer Reihe von Jahren erschienenen Arbeit¹⁾ über das Invertin der Hefe habe ich mich dahin ausgesprochen, daß ich die Versuche zur Reindarstellung des Invertins für aussichtslos halte, weil man bei einem Material, das mehrere Fermente enthält, nie wissen könne, ob ein Präparat, das nur eine Fermentwirkung — in diesem Falle die Inversionswirkung — zeigt, nicht auch die anderen, durch die Art der Behandlung unwirksam gewordenen Fermente beigemischt enthält. Unter diesen Umständen könnte es inkonsequent erscheinen, daß ich mich aufs neue der Frage nach der Natur des Invertins zuwende. Es könnte scheinen, als ob ich hinsichtlich der Möglichkeit der Isolierung von Invertin anderer Ansicht geworden wäre. Das ist aber durchaus nicht der Fall, ich bin noch derselben Ansicht, und wenn ich mich aufs neue mit dem Invertin beschäftigt habe, so ist das nicht geschehen, um einen Versuch zur Isolierung zu wagen — ein Unternehmen, das übrigens selbst bei Substraten, die nur ein Ferment enthalten, im besten Falle immer nur einen Wahrscheinlichkeitserfolg verspricht, da wir kein Kriterium zur Erkennung der Reinheit besitzen —, sondern nur, um mich mit zwei prinzipiell wichtigen Fragen über die Natur des Invertins zu beschäftigen, nämlich 1. ob das Invertin einen Kohlehydratkomplex enthält und 2. ob es phosphorhaltig ist.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 305.

Fragen, die auch von allgemeiner Bedeutung für die Fermente überhaupt sind. Ich werde mich hier nur mit der ersten Frage beschäftigen, die Erfahrungen, die ich über die zweite gemacht habe, einer besonderen Abhandlung vorbehaltend.

In der erwähnten Abhandlung habe ich nachgewiesen, daß die aus der Hefe dargestellten Invertinpräparate regelmäßig einen ansehnlichen — in meinen Versuchen von 17,17—65,3% wechselnden — Gehalt an Hefegummi aufweisen, welches bei der Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure Mannose liefert. Dies trifft nicht nur für meine Präparate zu, sondern sicher auch für alle bisher von Anderen¹⁾ dargestellten, deren Gehalt an Kohlenhydraten auch von verschiedenen Beobachtern hervorgehoben ist.¹⁾ Während aber die früheren Autoren den Kohlenhydratgehalt als zum Invertinmolekül gehörig angesehen haben, habe ich meine Überzeugung dahin ausgesprochen, daß das Hefegummi nur als Verunreinigung anzusehen sei. Ist doch auch nicht abzusehen, wie ein relativ so schwach wirkendes Reagens, wie die Fehlingsche Lösung, in gelinder Wärme eine Abspaltung von Hefegummi aus einem Atomkomplex herbeiführen sollte. Auch die Tatsache, daß der Gummigehalt der Invertinpräparate in weiten Grenzen schwankt, spricht — wenn auch nicht unbedingt²⁾ — für meine Ansicht. In dieser haben mich auch die inzwischen erschienenen Ausführungen von B. Hafner³⁾ nicht irre gemacht. Dieselben gipfeln ebenso wie die früheren von Osborne und Kölle immer in der Frage: warum soll das Invertin kein Kohlenhydrat in seinem Molekül enthalten, da dieses doch konstant in den dargestellten Präparaten enthalten ist? eine Frage, der man mit allem Recht die Gegenfrage entgegenhalten kann: warum soll das Invertin gerade ein Kohlenhydrat enthalten, da doch kein anderes Ferment mit Kohlenhydratgehalt bekannt ist und das Gummi, von dem nachweislich bei den Invertindarstellungen immer nur ein kleiner Teil in Lösung geht, nicht Verunreinigung sein?

¹⁾ Siehe die frühere Literatur in meiner zitierten Arbeit.

²⁾ Nicht unbedingt, weil das Gummi ja auch in zwei Formen vorhanden sein könnte, einer freien und einer gebundenen.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 1.

Ein Beweis dafür, daß das Hefegummi nichts mit dem Ferment zu tun hat, ist freilich nur dann geliefert, wenn es gelingt, stark wirksame gummifreie Fermentlösungen herzustellen. Wieweit mir das gelungen ist, wird aus den folgenden Ausführungen hervorgehen. Als Hilfsbeweis kann betrachtet werden, wenn man nachweisen kann, daß der Grad der Wirksamkeit und der etwa vorhandene Gummigehalt in keiner bestimmten Relation zueinander stehen.

Der Gang der Untersuchung war also im allgemeinen der, daß ich in auf verschiedene Weise hergestellten Auszügen aus Hefe — es kam stets möglichst amyllumfreie Preßhefe zur Anwendung — den Gummigehalt — wenn vorhanden — quantitativ bestimmte und die Wirksamkeit durch Digestion mit Rohrzuckerlösung feststellte. Außerdem schien es mir wünschenswert, in jedem Falle den Gehalt der verwendeten Lösung an fester Substanz und an Asche zu ermitteln. Dies geschah hauptsächlich zu einem andern Zweck: ich wollte behufs späterer Versuche über das Invertin feststellen, welche Lösungen bei guter Wirksamkeit relativ arm waren an gelöster organischer Substanz, oder mit andern Worten, in welchen Lösungen die Relation zwischen Wirksamkeit, ausgedrückt durch die in einer bestimmten Zeiteinheit und bei einer bestimmten Temperatur — 40° — gebildete Quantität Invertzucker, und Gehalt an fester Substanz am größten war. Da nach Barth¹⁾ das Optimum der Wirkung bei Anwendung 10 %iger Zuckerlösung liegt, so wurde stets eine solche Lösung angewendet. Dieselbe wurde jedesmal frisch aus etwa 5 g Kandiszucker in 50 ccm Wasser hergestellt. Die Digestion dauerte eine Stunde. Dabei wurde dafür gesorgt, daß die Rohrzuckerlösung schon vor dem Zusatz der Fermentlösung eine Temperatur von 40° hatte.

Die Bestimmung des Invertzuckers geschah durch Kochen mit Fehlingscher Lösung (2 Minuten) und Wägung des bei 120° getrockneten Kupferoxyduls, das stets eine rote Farbe hatte, bald mehr ziegelrot, bald fast scharlachrot. Da es sich in manchen Fällen nur um kleine Zuckermengen handelte,

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XI, S. 481.

habe ich dieses Verfahren der optischen Methode vorgezogen. Es gewährt mir auch das Gefühl größerer Sicherheit. Allerdings ist mir hin und wieder eine Bestimmung dadurch verloren gegangen, daß die Quantität der Fehlingschen Lösung zu gering bemessen war.

Einige Worte habe ich noch zu sagen bezüglich der Berechnung des Invertzuckers aus dem Kupferoxydul. Zunächst gelang es mir nicht, mir einen Rohrzucker zu verschaffen, von dem 5 g in 10%iger Lösung beim Kochen mit Überschuß von Fehlingscher Lösung absolut keine Reduktion gab: ein rötlicher Hauch von Kupferoxydul zeigte sich stets in der Schale. Dies scheint auch sonst als Tatsache angenommen zu werden, denn in den bekannten Tabellen von E. Weiss¹⁾ findet sich auf S. 17 die Bemerkung: «es wurde festgestellt, daß reiner Rohrzucker für sich mit Fehlingscher Lösung erhitzt, bedeutend weniger CuO reduziert, als wenn er mit Invertzucker gemengt auf die alkalische Kupferlösung einwirkt.» Weiss bezieht sich dabei auf Versuche von E. Meissl. Hier wird es also als bekannte Tatsache hingestellt, daß Rohrzucker Fehlingsche Lösung reduziert. Ich glaubte danach die geringfügige durch mein Rohrzuckerpräparat bewirkte Reduktion vernachlässigen zu können. Zur Berechnung des Invertzuckergehaltes wurde also das Cu_2O auf Cu umgerechnet und die betreffenden Werte aus den Weiss'schen Tabellen entnommen, wobei je nach dem Verhältnis zwischen Invertzucker und restierendem Rohrzucker die entsprechende Tabelle benutzt wurde. Um indessen dem Leser ein eigenes Urteil zu ermöglichen, habe ich auch die Zahlen für Cu_2O selbst angeführt.

Die Prüfung auf Gummigehalt und die Bestimmung der Menge beruhte auf der von mir²⁾ angegebenen Ausscheidung desselben als Gummikupferverbindung beim Erwärmen mit Fehlingscher Lösung. Es sei hierüber noch folgendes bemerkt. Die betreffenden Lösungen wurden in allen Fällen auf ca. 25 ccm eingedampft. Wenn man zu einer solchen Lösung Natronlauge

¹⁾ E. Weiss, Tabellen zur quantitativen Bestimmung der Zuckerarten. Stuttgart 1888. Verlag von Max Wang.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 499.

hinzusetzt, entsteht in jedem Falle eine aus Erdphosphaten bestehende Trübung, die sich bei gelindem Erwärmen zusammenballt. Dasselbe muß natürlich auch eintreten bei Zusatz von Fehlingscher Lösung. Wenn die Lösungen Purinbasen enthalten — das ist namentlich bei Anwendung von getrockneter erhitzter Hefe der Fall —, enthält der Niederschlag auch Kupferverbindungen¹⁾ dieser. Man kann also aus der Bildung eines Niederschlages keinesfalls auf die Gegenwart von Gummi schließen. Meistens ballt sich der Niederschlag beim Vorhandensein von Gummi zu einem kleinen Klümpchen zusammen, doch ist dies nicht ausnahmslos der Fall, der Niederschlag muß also näher untersucht werden. Da der Gummikupferniederschlag sich langsam bildet und seine Ausscheidung durch Erwärmen befördert wird, so wurde die eingedampfte Flüssigkeit, nach Zusatz von etwas Natronlauge und soviel Fehlingscher Lösung, daß sie intensiv blau erschien, etwa eine halbe Stunde oder etwas länger auf dem Wasserbad erhitzt, dann bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Die Gummikupferverbindung wurde dann, häufig nach Zusatz von etwas Wasser, um die Filtration der alkalischen Lösung zu befördern, abfiltriert²⁾ und etwas ausgewaschen, dann durch Aufgießen von möglichst wenig verdünnter Salzsäure (etwa 1 Vol. Salzsäure von 1,124 D und 2 Vol. Wasser) gelöst und mit wenig Wasser nachgewaschen. Man darf nicht zuviel waschen, damit die zu fällende Lösung nicht zu verdünnt wird. Mitunter habe ich das ausgewaschene feuchte Filter aus dem Trichter herausgenommen und zwischen den Fingern ausgedrückt. Die Lösung wird mit ca. dem 7—8fachen Alkohol absolutus versetzt und bis zum nächsten Tage stehen gelassen, das ausgeschiedene Gummi auf einem getrockneten gewogenen Filter gesammelt, sehr sorgfältig zuerst mit 90%igem, dann mit absolutem Alkohol, schließlich mit Äther gewaschen, bei 115° getrocknet, gewogen. Öfters habe ich das Gummi noch verascht und die durch Beimischung von etwas Kupferoxyd schwärz-

¹⁾ Ganz überwiegend solche, deren salpetersaure Silberverbindung sich aus heißer Salpetersäure beim Erkalten ausscheidet.

²⁾ Manchmal ließ sich auch die Gummikupferverbindung durch Dekantieren waschen.

lich gefärbte Asche gewogen. Da dies aber nicht regelmäßig geschehen ist, habe ich die übrigens minimale Aschenmenge — 1 mg und darunter — nicht in Abzug gebracht.

Sehr häufig wurde das alkoholische Filtrat und der Wasch-alkohol noch auf einen etwaigen Gehalt an gelöstem Gummi untersucht. Zu dem Zweck wurden die gesamten alkoholischen Filtrate verdampft, der Rückstand in einigen Kubikzentimetern Wasser gelöst, filtriert, das Filtrat mit etwa $\frac{1}{2}$ Vol. rauchender Salzsäure versetzt, ca. 1 Minute im Sieden erhalten, nach dem Erkalten mit konzentrierter Natronlauge übersättigt und mit Fehlingscher Lösung erhitzt: es wurde keine positive Trommersche Probe erhalten, wie es bei den geringsten Spuren von Gummi regelmäßig der Fall ist.

Das ganze Verfahren der Gummibestimmung kann allerdings nicht auf die Bezeichnung eines quantitativen im strengsten Sinne des Wortes Anspruch machen, der Fehler ist aber, da es sich ausnahmslos um sehr kleine Mengen von Gummi handelt, jedenfalls absolut sehr gering und auch relativ sicher nicht erheblich.

I. Versuche mit frischer Hefe und Wasser.

Den Ausgangspunkt bildete die schon in meiner früheren Arbeit mitgeteilte Beobachtung, daß bei kurzem Digerieren von getrockneter Hefe mit Wasser bei Zimmertemperatur nur sehr wenig Gummi in Lösung geht. Ich setzte voraus, daß dieses noch weniger, vielleicht gar nicht der Fall sein werde, wenn man bei möglichst niedriger Temperatur arbeitet. Es wurde also die Hefe, das Wasser und alle in Betracht kommenden Utensilien möglichst auf 0° abgekühlt.¹⁾

Die Preßhefe wurde in einem Zylinder mit der doppelten Quantität Eiswasser verrührt. Die Verteilung geschah in möglichst schonender Weise, um die Hefezellen möglichst wenig zu schädigen. Sie gelingt durch einfaches Rühren oder, richtiger, rotierende Bewegungen mit dem Spatel. Die Mischung

¹⁾ Die folgenden allgemeinen Bemerkungen gelten sinngemäß auch für die anderen Versuchsanordnungen.

wurde durch ein nicht angefeuchtetes Filter (Schleicher und Schütt 597) filtriert. Die ersten Kubikzentimeter, mitunter auch nur die ersten Tropfen, gehen etwas trübe durch, bald aber wurde nach ein- oder zweimaligem Zurückgießen das Filtrat ganz klar. Sobald dies eintrat, wurde der Zylinder mit dem aufgesetzten Trichter in den Eisschrank gestellt und bis zum nächsten Tage sich selbst überlassen. Die Filtration erfolgt äußerst langsam, liefert aber in der angegebenen Zeit genügende Mengen von Filtrat. Das Filtrat war farblos und ganz klar, bei auffallendem Licht konnte man allenfalls einen leichten weißlichen Schimmer konstatieren; am Boden des Zylinders fand sich aber regelmäßig eine kaum wahrnehmbare Schicht von Hefezellen abgesetzt. Die Flüssigkeit wurde daher, ohne diese Schicht aufzurühren, mit der Pipette abgesogen, dann erst nachträglich das Volumen festgestellt. Versuche, in denen es nicht gelang, ein ganz klares Filtrat zu erhalten — das kam ab und zu vor —, wurden verworfen.

Bezüglich des Verhaltens des Filtrates zu Reagenzien sei folgendes bemerkt.

1. Erhitzen zum Sieden, auch unter Zusatz von Essigsäure + Chlornatrium: 0.
2. Essigsäure + Ferrocyankalium: 0.
3. Millons Reagens: schwache rötliche Färbung.
4. Sog. Xanthoproteinreaktion (nach Zusatz von Natronlauge): schwache gelbliche Färbung.
5. Phosphorwolframsäure + Salzsäure: leichte weißliche Trübung.
6. Tannin: Opalescenz.

Bei tropfenweisem Zusatz von Fehlingscher Lösung zu dem stark eingedampften, mit etwas Natronlauge versetzten Filtrat trat stets Violettfärbung ein: es war also zwar nicht gerinnbares Eiweiß, wohl aber Albumose oder Pepton vorhanden.

Zur Bestimmung der Trockensubstanz und Asche dienen 25 ccm, zur Gummibestimmung 60—80 ccm, zur Feststellung des Inversionsvermögens wurde 1 ccm zu 50 ccm einer ungefähr 5 g Rohrzucker enthaltenden Lösung gesetzt, 1 Stunde bei 40° digeriert, erhitzt, nach dem Erkalten auf 100 ccm

aufgefüllt, 2,5—50 ccm, mitunter auch die ganze Quantität zur Reduktion mit Fehlingscher Lösung verwendet.

Die Resultate sind in folgender kleiner Tabelle zusammengestellt.

Num- mer. des Ver- suches	Quan- tität der Hefe g	Quan- tität des Fil- trates ccm	100 Teile des Filtrates enthalten		Gehalt des Trocken- rückstan- des an Gummi in %	1 ccm liefert Cu ₂ O aus Invert- zucker bei 1 stün- diger Digestion	Quantität des Invert- zuckers	Verhältnis des organischen Trockenrück- standes zu dem in 1 Stunde ge- bildeten Invertzucker
			Or- ganischen Trocken- rückstand	Gummi				
1	65	110	0,1048	0,0143	10,9	0,3676	0,1690	161
2	73	113	0,188	0,0298	15,8	0,6282	0,3026	160,6
3	65	110	0,1928	0,0283	14,6	0,6286	0,3026	156,9

Von dem Filtrat des Versuchs 3 wurde außerdem 1 ccm mit ca. 5 g Rohrzucker in 10%iger Lösung 24 Stunden bei 40° digeriert, auf 100 ccm aufgefüllt, 5 ccm zur Bestimmung verwendet. Es wurde erhalten 0,453 Cu₂O = 4,528 Invertzucker im ganzen. Die organische feste Substanz ist also imstande, in 24 Stunden das 2348fache ihres Gewichtes Invertzucker zu bilden resp. das 2140fache ihres Gewichtes Rohrzucker zu spalten; der Rohrzucker war zu mehr als $\frac{4}{5}$ invertiert. Wie sehr, nebenbei bemerkt, das Ferment durch die Einwirkung von Alkohol geschädigt wird, geht daraus hervor, daß das von Barth dargestellte «Invertin» in einer halben Stunde nur das 20,8fache, also in 1 Stunde das 41,6fache des Gewichtes Invertzucker bildete, während in den obigen Versuchen ein Teil des organischen Trockenrückstandes das 160fache seines Gewichtes Invertzucker bildete, also fast 4mal so wirksam war, wie das isolierte Invertin.

Aus diesen Versuchen geht hervor:

1. Daß bei einfacher Digestion mit destilliertem Wasser auch bei möglichst niedriger Temperatur eine ansehnliche Quantität Gummi in Lösung geht, ansehnlich in bezug auf die Quantität der Trockensubstanz, dagegen nur ein sehr geringer Bruchteil des in der Hefe vorhandenen Gummis. Nach meinen

früheren Versuchen¹⁾ beträgt der Gummigehalt der Preßhefe fast genau 2^o/_o.²⁾ Die angewendeten 65 g Hefe des Versuches 1 haben also enthalten 1,30 g Gummi, der Gehalt des Filtrates an Gummi betrug 0,0143 für 100 Teile, also für 130 ccm 0,0186. Das ist etwa der 70. Teil des vorhandenen Gummis oder 1,4^o/_o desselben; ebenso berechnen sich für Versuch 2: 2^o/_o, für Versuch 3: 2,17^o/_o.

2. Es folgt ferner, daß auch, entgegen der gewöhnlichen Annahme, Wasser ohne Anwendung eines Protoplasmagiftes oder des von Hoppe-Seyler ursprünglich angegebenen Äthers eine erhebliche Menge Invertin aus der Hefe auszieht. Das geht eigentlich schon aus der Tatsache hervor, daß Hefe, in Rohruckerlösung verschiedenster Konzentration eingetragen, den Rohrucker invertiert und in Gärung versetzt. Sehr bemerkenswert ist das konstante Verhältnis zwischen dem organischen Trockenrückstand und dem gebildeten Invertzucker, obwohl in Versuch 1 sehr viel weniger feste Substanz in Lösung gegangen war.

Da der gewünschte Erfolg bezüglich des Gummigehaltes nicht erreicht war, versuchte ich nun zunächst die Anwendung von Chloroformwasser. Die Versuchsanordnung war dieselbe, auch hier wurde von der Anwendung der Kälte Gebrauch gemacht.

II. Versuche mit frischer Hefe und Chloroformwasser.

Bezüglich des allgemeinen Verhaltens der Filtrate gilt dasselbe, wie für die Auszüge mit Wasser. Auch diese Filtrate waren vollständig klar, das gilt aber nur für den ersten Auszug, die folgenden (siehe weiter unten) hatten ein merklich opakes Aussehen.

Das Verhalten zu Reagenzien war dasselbe, die Reaktionen waren jedoch, soweit sie überhaupt vorhanden, noch schwächer. Mit Millons Reagens z. B. entstand nur eine rötlichgelbe Trübung. Die eingedampften Lösungen gaben stets Biuretreaktion. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 502.

²⁾ In späteren Versuchen mit kleineren Mengen Hefe habe ich etwas mehr gefunden, doch mag dies hier unberücksichtigt bleiben.

Num- mer des Ver- suches	Quan- tität der Hefe g	Quan- tität des Fil- trates ccm	100 Teile des Filtrates enthalten		Gehalt des or- ganischen Trocken- rück- standes an Gummi in %	1 ccm Fil- trat lie- fert Cu_2O aus Invert- zucker bei 1 stün- diger Digestion	Quantität des aus 1 ccm gebildeten Invert- zuckers	Der or- ganische Trockenrück- stand verhält sich zum Invertzucker = 1:
			Or- ganischen Trocken- rückstand	Gummi				
4	96	140	0,1080	0,0191	17,6	0,5084	0,251	232
5	100	156	0,2296	Spur	—	0,3232	0,1723	75
6	114	175	0,1288	0,0138	10,8	0,567	0,285	221
7	88	155	0,2808	0,0102	3,6	0,3344	0,152	54
7a	—	156	0,1616	Spur	—	0,2048	0,0893	55
7b	—	158	0,1800	0	0	0,1268	0,0549	30,5
7c	—	160	0,1224	0	0	0,0982	0,0426	34,8
7d	—	155	0,1504	0	0	0,0623	0,0269	26,9

Die Nummern 7a—7d bedürfen der Erläuterung.

Es schien mir nicht undenkbar, daß eine zweite Extraktion der bereits einmal extrahierten Hefe mit Chloroformwasser ein gummifreies, aber doch noch fermenthaltiges Filtrat liefern könne. Der bei Versuch 7 gebliebene Rückstand wurde daher samt dem Filter mit kaltem Chloroformwasser geschüttelt: Versuch 7a. Ebenso wurde mit dem dabei gebliebenen Rückstand verfahren. Der nun gebliebene, aus Hefe und Papierfasern bestehende Rückstand wurde, so gut es ging, vom Filter genommen und wieder mit Chloroformwasser übergossen: Versuch 7c, ebenso ergab die nochmalige Extraktion 7d.

Bezüglich des Gehaltes der Filtrate an Gummi hat die Extraktion mit Chloroformwasser nichts wesentlich anderes ergeben, wie die mit Wasser allein, nur in Versuch 7 war der Gehalt an Gummi, bezogen auf den organischen Trockenrückstand, erheblich geringer, in Versuch 5 sind nur Spuren in Lösung gegangen, dagegen hat es sich gezeigt, daß die auf die erste Extraktion folgenden ein Filtrat liefern, welches Invertin, aber kein Gummi enthält. Wenn der Gehalt an Invertin auch gering ist, so ist damit doch prinzipiell der Beweis geliefert, daß das Invertin von Gummi unabhängig ist, daß der bisher konstant

gefundenen Gummigehalt der Invertinpräparate nur eine Verunreinigung darstellt, wie ich stets behauptet habe. Es ist wohl möglich, daß auch bei Anwendung von Wasser allein sich die späteren Extrakte als gummifrei erweisen würden, ich fand es aber überflüssig, diese Versuche noch anzustellen.

Sehr auffallend sind die großen Unregelmäßigkeiten in dem Gehalt der Auszüge an Trockensubstanz und in ihrem Inversionsvermögen. Eine Erklärung derselben vermag ich nicht zu geben: sie müssen an Verschiedenheiten der Preßhefe oder an kleinen Abweichungen bei der Extraktion einschließlich der doch etwas wechselnden Temperatur gelegen sein.

Bemerkenswert erscheint, daß auch die fünfte Extraktion mit Chloroformwasser immer noch Invertin im Auszug ergab. Um den Verdacht auszuschließen, daß die Reduktion vielleicht gar nicht vom gebildeten Invertzucker, sondern von dem Chloroformgehalt des Auszuges herrühre, wurde folgender Versuch ausgeführt. 1 ccm Chloroformwasser wurde zu 50 ccm Wasser gesetzt und die Mischung 1 Stunde lang im Glasstöpselzylinder (alle Versuche sind in solchen ausgeführt) in den Thermostaten gestellt, dann in verdünnte, siedende Fehlingsche Lösung (50 ccm Lösung 50 ccm Wasser) gegossen und 2 Minuten im Sieden erhalten. Es schied sich keine Spur von Kupferoxydul aus. Damit ist festgestellt, daß der fünfte Anzug tatsächlich noch Invertin enthält.

Ja! selbst mit der fünften Extraktion ist der Invertingehalt noch nicht erschöpft! Der auf dem Filter gebliebene Rückstand wurde sich selbst überlassen und ging dabei in starke Fäulnis über. Nach 6 Tagen wurde er mit der in den frühern Versuchen 7 angewendeten Quantität — 176 ccm — Chloroformwasser durchgeschüttelt und filtriert. Das Filtrat (die Quantität ist nicht notiert) enthielt reichlich Gummi, in 100 Teilen 0,9128 Trockenrückstand, wovon 0,2812 anorganisch, also 0,6256 organisch. 1 ccm mit 5 g Rohrzucker 1 Stunde digeriert gab 0,1422 Cu_2O , also mehr als doppelt soviel, wie die letzte Extraktion. Die Widerstandsfähigkeit des Invertin gegen Fäulnis ist sehr bemerkenswert und ein weiterer Beweis für die Nichteisweißnatur desselben.

Um die Widerstandsfähigkeit des Invertins gegen Fäulnis noch weiterhin zu erproben, wurde folgender Versuch angestellt.

95 g Preßhefe wurden in 190 ccm Wasser verteilt, etwa 1 ccm einer faulenden Fleischmaceration hinzugesetzt und die Mischung in einen Wärmeschrank (40°) gestellt. Schon am nächsten Tage war intensive Fäulnis zu konstatieren. Die Mischung blieb im ganzen 4 Tage im Wärmeschrank, wurde dann, nachdem sie noch 24 Stunden im Eisschrank gestanden hatte, durch ein trockenes Filter filtriert. Der Filtrat war nach mehrmaligem Zurückgießen der ersten Anteile ganz klar (bis auf einen ganz dünnen Bodensatz), gelb gefärbt. Abfiltriertes Volumen 192 ccm.¹⁾

1 ccm wurde nun zu 5 g Rohrzucker in 10%iger Lösung gesetzt, 1 Stunde bei 40° digeriert, erhitzt, auf 100 ccm (nach dem Abkühlen) aufgefüllt. 50 ccm gaben 0,4618 Cu_2O = 0,2293 Invertzucker, also für die ganze Quantität 0,4586 g. Das ist bedeutend mehr, als bei den Versuchen der Extraktion mit Wasser gefunden wurde (die betreffenden Werte sind 0,169 — 0,3026 — 0,3026 Invertzucker). Man kann also wohl mit Bestimmtheit sagen, daß das Invertin durch viertägige intensive Fäulnis nicht angegriffen wird.

Vielleicht ist in dem Verhalten der Fermente zu Fäulnisbakterien ein Hilfsmittel zur Erforschung ihrer Natur gegeben. Ich möchte mir vorbehalten, die Versuche mit Invertin nach dieser Richtung hin fortzusetzen und sie auf andere Fermente auszudehnen.

III. Versuche mit Trockenhefe und Wasser.

Da die ersten Beobachtungen über geringen Gehalt der Auszüge an Gummi mit Trockenhefe angestellt waren — es ist darunter stets an der Luft getrocknete und dann 6 Stunden bei 110° erhitzte Hefe verstanden —, so habe ich auch mit dieser Versuche angestellt.

¹⁾ Daß in diesem Falle die Quantität des Filtrates größer war, als die Quantität des angewendeten Wassers, trotzdem nicht alles abfiltriert war, rührt davon her, daß die Hefe bis auf einen unbedeutenden Rest in Lösung gegangen war.

10 g Trockenhefe wurden mit 80 ccm¹⁾ Eiswasser (resp. 15 g mit 120 ccm) in einer eiskalten Reibschale verrieben, und im Eisschrank durch ein nicht angefeuchtetes Filter filtriert. Die Filtration erfolgte äußerst langsam, war jedoch am nächsten Tage oder im Lauf des nächsten Tags ganz oder nahezu beendigt. Das Filtrat war — nach mehrmaligem Zurückgießen der ersten Anteile — ganz klar, jedoch gelblich gefärbt. Es enthielt stets reichlich Eiweiß und auch viel Albumose, was sich aus der bei der Darstellung der Trockenhefe stattfindenden Autolyse erklärt. Unter den Eiweißkörpern befindet sich ein durch Essigsäure fällbarer.

Vom Filtrat dienten 10 ccm zur Bestimmung von Trockenrückstand und Asche, 1 ccm zur Feststellung des Inversionsvermögens (dabei wurde die invertierte Zuckerlösung auf 100 ccm aufgefüllt und 50 oder 25 ccm zur Bestimmung verwendet), der Rest zur Gummibestimmung.

Drei Versuche ergaben folgende Resultate:

Nummer des Versuches	Quantität der Trockenhefe g	Quantität des Filtrates ccm	100 Teile des Filtrates enthalten		Gehalt des organischen Trockenrückstandes an Gummi in %	1 ccm Filtrat lieferte Cu ₂ O aus Invertzucker bei 1 stündiger Digestion	Quantität des aus 1 ccm gebildeten Invertzuckers	Verhältnis des organischen Trockenrückstandes zu Invertzucker = 1
			Organischen Trockenrückstand	Gummi				
8	10	52	2,440	0,0755	3,1	0,8145	0,3896	16,0
9	10	52	2,256	0,0813	3,6	0,9320	0,4572	20,3
10	15	67	2,570	0,0086	0,33	1,116	0,560	21,8

Wie man sieht, sind die aus der Trockenhefe erhaltenen Lösungen etwa 10mal so konzentriert oder noch mehr, wie die aus frischer Hefe gewonnenen. Dem entspricht auch ein weit höherer Gehalt an Gummi, wenigstens in 2 Versuchen. Bezogen auf den Trockenrückstand ist der Gummigehalt allerdings geringer, in einem Falle erheblich geringer. Die Wirk-

¹⁾ Anfangs wurden nur 50 ccm genommen, doch war diese Mischung nicht filtrierbar.

samkeit der Filtrate ist etwas, aber nur unbedeutend größer, wie die aus frischer Hefe. Bezieht man aber die Wirksamkeit auf den Gehalt an Trockensubstanz, so erscheint sie unvergleichlich geringer, als bei der frischen Hefe, mit anderen Worten: die aus der Trockenhefe erhaltenen Fermentlösungen sind weit unreiner.

IV. Versuche mit Trockenhefe und Chloroformwasser.

Mehr der Vollständigkeit wegen und ohne mir besonders viel davon zu versprechen, habe ich noch Versuche mit Trockenhefe und Chloroformwasser, gleichfalls bei möglichst niedriger Temperatur ausgeführt. Gegen meine Erwartung zeigten sich in zwei von den drei angestellten Versuchen die Filtrate gummifrei.

Über die Anstellung der Versuche habe ich nichts weiter zu sagen, die Filtrate waren ganz klar, gelblich, das Verhalten zu Reagenzien ganz ebenso wie das der Filtrate mit Wasser. Der dritte Versuch (Nr. 13) verlief abnorm. Obwohl bei diesem 20 g Trockenhefe und 160 Chloroformwasser zur Anwendung kamen, waren am nächsten Tage kaum 25 ccm durchfiltriert, nach 48 Stunden 48 ccm. Die Resultate sind tabellarisch zusammengestellt.

Num- mer des Ver- suches	Quan- tität der Trocken- hefe g	Quan- tität des Fil- trates ccm	100 Teile des Filtrates enthalten		Gehalt des or- ganischen Trocken- rück- standes an Gummi in %	1 ccm Fil- trat lie- ferte Cu_2O aus Invert- zucker bei 1 stün- diger Digestion	Quantität des aus 1 ccm gebildeten Invert- zuckers	Verhältnis des or- ganischen Trockenrück- standes zum Invertzucker = 1 :
			Or- ganischen Trocken- rückstand	Gummi				
11	15	70	2,358	0	0	0,7958	0,3583	15,0
12	15	70	2,308	0	0	0,8152	0,3796	16,3
13	20	48	2,220	0,0400	1,8	0,8816	0,3852	17,3

Überblickt man die Gesamtheit der Versuche, so läßt sich nicht verkennen, daß die Ergebnisse wegen ihrer fast in allen Punkten — oder wenigstens in sehr vielen — hervortretenden Inkonstanz, für die eine Erklärung mangelt, etwas sehr Unbefriedigendes haben, indessen steht doch soviel fest, daß es

unter Umständen gelingt, stark wirksame Invertinlösungen zu erhalten, in denen sich auch nach starkem Eindampfen Gummi nicht nachweisen läßt.

Weiterhin habe ich noch versucht, aus gummihaltigen wirksamen Lösungen das Gummi durch Fällungsmittel resp. Adsorbentien auszufällen, diesen bisher negativ ausgefallenen Versuchen aber keine größere Ausdehnung gegeben, da mir durch die vorliegenden Versuche genügend erwiesen zu sein scheint, daß das Gummi nichts mit dem Invertinmolekül zu tun hat. Aus diesem Grunde habe ich auch Versuche mit Dauerhefe für entbehrlich gehalten.

Zusammenfassung.

1. Bei der Extraktion von Preßhefe mit Wasser bei möglichst niedriger Temperatur gehen entgegen der gewöhnlichen Annahme erhebliche Mengen von Invertin in Lösung: die organische feste Substanz derselben bildete in einer Stunde bei 40° das 160fache ihres Gewichtes an Invertzucker.

2. Diese Auszüge enthalten ebenso wie die entsprechenden Chloroformwasserauszüge kein Eiweiß, dagegen kleine Mengen von Albumosen, sie enthalten ferner in der Regel Gummi, jedoch gelingt es, wenigstens mit Chloroformwasser, auch gummifreie Auszüge zu erhalten.

3. Die Auszüge aus getrockneter erhitzter Hefe mit Wasser oder Chloroformwasser enthalten etwas mehr Ferment, wie die mit frischer Hefe, da sie aber sehr reich sind an gelöster Substanz, so ist das Verhältnis von fester (organischer) Substanz zu dem in 1 Stunde gebildeten Invertzucker ein sehr ungünstiges, im besten Fall = 1 : 21,8.

4. Auch die Auszüge aus getrockneter erhitzter Hefe sind unter Umständen gummifrei.

5. Das Invertin enthält kein Gummi im Molekül.

6. Das Invertin bleibt beim Faulen der Hefe unverändert, wird also durch Fäulnisbakterien nicht angegriffen.
