

35. L. Geret und M. Hahn: Zum Nachweis des im Hefepresssaft enthaltenen proteolytischen Enzyms.

(Eingegangen am 26. Januar.)

Mittelst der Pressmethode erhält man aus der Hefe — die benutzte Hefe stammte im Allgemeinen aus der gleichen Quelle, wie die von E. Buchner verwandte — eine opalescirende Flüssigkeit, die nach mehrmaliger Filtration durch mit Kieselguhr gedichtete Papierfilter nur noch vereinzelte Hefezellen enthält. Wird die zunächst sauer reagirende Flüssigkeit mit Chloroform versetzt und sodann bei 37° im Thermostaten digerirt, so entsteht schon in wenigen Stunden ein starker Niederschlag, der sich bei ruhigem Stehen bald zu Boden senkt und zum grössten Theile aus Eiweiss besteht. Diese Fällung beruht z. Th. auf den Spaltungen und Umsetzungen, die in der Flüssigkeit vor sich gehen, z. Th. ist sie wohl aber auch durch das Chloroform hervorgerufen. Schon nach circa 2 Tagen bemerkt man eine deutliche Verminderung dieses Niederschlages, die rasch fortschreitet, sodass nach 4—5 Tagen die Flüssigkeit wieder klar wird. Ein geringer Niederschlag bleibt allerdings bestehen und nimmt sodann nach einigen Wochen wieder etwas zu. Untersucht man das Sediment am 6. bis 8. Tage, so bemerkt man darin in der Regel schon Krystallbüschel, welche die charakteristische Form des Tyrosins zeigen. Nach 2—4 Wochen erhält man bei der Filtration schon grössere Mengen derartiger Krystalle, welche die Hofmann'sche Reaction geben. Dampf man die Flüssigkeit ein, so erhält man einen dichten Krystallbrei, aus dem leicht grosse Mengen von Leucin isolirt werden können. Es tritt in der charakteristischen Kugelform auf, konnte in Leucinkupfer übergeführt werden und liess sich in den bekannten flockig-wolligen Massen sublimiren. Albumosen treten während des ganzen Spaltungsprocesses nur vorübergehend auf, echtes Pepton nachzuweisen ist uns vorläufig nicht gelungen. Das Verhalten der Xanthinkörper, des Phosphors und Schwefels der Eiweisskörper, sowie der stickstofffreien Körper wird gegenwärtig von uns noch näher untersucht. Der Phosphor wird schon in den ersten 24 Stunden der Digestion des Presssaftes zum grössten Theil aus dem Nucleoalbumin abgespalten. Der Schwefel, von dem nur sehr geringe Mengen im Presssaft enthalten sind, scheint zum grössten Theile in Schwefelsäure überzugehen.

∴ Zunächst seien hier nur einige Untersuchungsreihen angeführt, welche das Verschwinden des coagulirbaren Eiweisses und die Zunahme des Stickstoffs im Filtrat für den bei 37° digerirten Presssaft darthun. Die Versuche wurden in der Weise angestellt, dass

von einer grösseren Quantität des Hefepresssaftes, der dauernd bei 37° gehalten wurde, in verschiedenen Zwischenräumen nach gutem Durchschütteln Proben entnommen wurden. In einer Probe wurde der Trockenrückstand (nach Trocknung bei 100°) und der Aschengehalt bestimmt. In einer anderen Portion wurde dann durch Aufkochen unter Zusatz von concentrirter Kochsalzlösung und Essigsäure das Eiweiss coagulirt, abfiltrirt, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und gewogen.

In zwei Reihen wurde auch noch in dem gewogenen Coagulat der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Nach 6—8 Tagen enthält freilich die Flüssigkeit kaum noch coagulirbares Eiweiss, der Niederschlag besteht vielmehr grösstentheils aus Leucin und Tyrosin und nur um vergleichbare Resultate zu gewinnen, wurde das gleiche Verfahren weiter angewendet. In einer dritten Portion wurde, nachdem sie gleichfalls durch Kochen etc. vom coagulirbaren Eiweiss befreit war, der Stickstoffgehalt eines abgemessenen Theiles des Filtrates bestimmt. Eine vierte Portion diente zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs. Die Sterilität der Flüssigkeit wurde selbstverständlich wiederholt durch anaërobe und aërobe Cultur controllirt.

I. Versuchsreihe: Hefepresssaft vom 13/7.

In Procenten der Flüssigkeit			
Datum	Coagulat gewogen	Stickstoff des Filtrates	Bemerkungen
13/7.	4.15	0.398	frisch
17/7.	0.165	1.03	nach 4 Tagen
19/7.	0.05	0.98	nach 6 Tagen

II. Versuchsreihe: Hefepresssaft vom 20/10.

In Procenten der Flüssigkeit						
Datum	Gesamt-Rückstand	Gesamt-Stickstoff	Coagulat gewogen	Coagulat-Stickstoff	Filtrat-Stickstoff	Bemerkungen
20/10.	9.3	1.03	4.38	0.64	0.42	frisch
21/10.	—	—	1.43	0.19	0.85	nach 1 Tag
26/10.	—	—	0.14	0.02	1.03	nach 6 Tagen

III. Versuchsreihe: Hefepresssaft vom 4/11.

In Procenten der Flüssigkeit							Bemerkungen
Datum	Gesamt-Rückstand	Gesamt-Asche	Gesamt-Stickstoff	Coagulat gewogen	Coagulat Stickstoff	Filtrat-Stickstoff	
4/11.	12.12	1.82	1.44	5.99	0.93	0.52	frisch
5/11.	—	—	—	1.87	0.25	1.19	nach 1 Tag
6/11.	—	—	—	0.5	0.05	1.40	nach 2 Tagen
8/11.	—	—	—	0.28	0.025	1.42	(Sediment ungeformt kein Leucin oder Tyrosin mikroskopisch nachweisbar) nach 4 Tagen
10/11.	—	—	—	0.21	0.02	1.44	9/10. Saft trübe, stei 10/11. Tyrosinbüsch im Sediment nach 6 Tagen
4/12.	—	—	1.44	—	0.16	1.26	nach 30 Tagen

Die gleichen Resultate bezüglich der Abnahme des Coagulats gaben uns Presssäfte, die aus 2 verschiedenen Getreidehefen gewonnen waren und nur schwache Gährwirkung zeigten.

	Coagulat in Procenten	
	vor der Digestion	nach 20-stündiger Digestion bei 37°
1. Presssaft aus Hefe Lechner	2.72	0.87
2. Presssaft aus Hefe Wieninger	3.4	0.69

Die günstigste Temperatur für die Digestion scheint zwischen 37° und 50° zu liegen.

	Coagulat in Procenten	
	vor der Digestion	nach 20-stündiger Digestion bei 37°
1. bei +3 bis +7°	2.72	2.57
2. bei +22°	4.71	3.93
3. bei +37°	4.71	2.71
4. bei +48°	4.71	2.42

Die Vernichtung des Enzyms erfolgt, wenn der Presssaft eine Stunde lang auf 60° erhitzt wird. Die nachfolgende Digestion bei 37° lässt erkennen, dass sodann keine Verminderung des Coagulats mehr eintritt.

nach 1-stündigem Erhitzen auf	Coagulat in Procenten	
	vor der Digestion	nach 20-stündiger Digestion bei 37°
1. 50°	3.4	1.36
2. 55°	3.4	1.99
3. 60°	3.4	3.36
4. nicht erhitzte Controllprobe zu 1—3	3.4	0.69
5. 65°	2.72	2.57
6. nicht erhitzte Controllprobe zu 5	2.72	0.87

Hygienisches Institut der Universität München.

36. Robert Schiff: Scheidung der beiden desmotropen Formen des Acetessigesters.

(Eingegangen am 2. Februar.)

Vor Kurzem schrieb L. Knorr¹⁾ in seiner bemerkenswerthen Arbeit: »Ueber isomere Diacetbernsteinsäureester«:

»Man wird annehmen dürfen, dass die flüssigen tautomeren Verbindungen, wie z. B. Acetessigester Gemische der desmotropen Formen darstellen. Die Trennung der Bestandtheile dieser Gemische dürfte schwierig sein und könnte höchstens bei niederen Temperaturen gelingen.«

Folgende Ueberlegungen haben mir den Weg gezeigt, die Ausscheidung der einzelnen Formen aus diesen Gemischen mittelst chemischer Eingriffe in einfacher Weise auszuführen.

Nehmen wir an, Acetessigester sei bei mittlerer Temperatur ein im Gleichgewichtszustande befindliches Gemisch ungefähr gleicher Mengen von Keto- und Enol-Formen. Physikalische Beobachtungen lassen uns annehmen, dass bei bedeutenden Temperaturänderungen sich die Gleichgewichtslage nach der einen oder der andern Seite hin verschieben kann.

Bringt man zu dem Ester kleine Mengen einer Substanz, welche nur auf die eine der desmotropen Formen, z. B. die Ketoform, einwirkt (Phenylhydrazin, Hydroxylamin), so wird diese Form durch Umsetzung theilweise dem Gemische entzogen und der Gleichgewichtszustand gestört. In Folge dessen wird ein entsprechender Theil der

¹⁾ Diese Berichte 30, 2389.