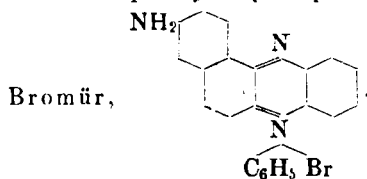


Isorosindulin No. 13.

Salze des 8-Amino-phenylnaphtophenazoniums.



Entsteht aus dem Vorigen durch vorsichtiges Erwärmen mit 50-procentiger Schwefelsäure, Verdünnen mit Wasser, Neutralisiren mit Natriumcarbonatlösung, Aussalzen mit festem Bromnatrium und Reinigen des grünlich-grauen Niederschlags durch Auflösen in wenig Wasser, Filtriren und Fällen mit concentrirter Bromnatriumlösung. Man erhielt so dunkel graugrüne Nadelchen, welche sich in Wasser mit braunrother, in Alkohol mit dunkelgrüner Farbe leicht lösen. Englische Schwefelsäure löst mit blutrother Farbe, welche auf Wasserzusatz unter Bildung des zweisäurigen Salzes grünlichgelb und erst durch Neutralisiren braunroth wird. Das Salz ist sehr unbeständig und geht beim Kochen seiner Lösungen ziemlich schnell unter Oxydation in Aminorosindon über. Seine grüne alkoholische Lösung wird auf Zusatz von etwas Ammoniak bald gelblichroth unter Bildung von Aminorosindulin.

Die beiden letzt-beschriebenen Substanzen konnten leider in Folge des grossen, durch die vielen Umwandlungen bedingten Materialverlustes nicht in zur Analyse genügenden Quantitäten erhalten werden. Dieselben sollen daher von Neuem dargestellt, analysirt und zugleich besser untersucht werden.

Genf, 4. November 1900. Universitätslaboratorium.

548. Eduard Buchner: Zymase aus getödteter Hefe.

[Aus dem chem. Laboratorium der Landwirthschaftl. Hochschule zu Berlin.]

(Vorgetragen in der Sitzung von Hrn. E. Buchner.)

Unter der Ueberschrift: »Neuer Beweis für die Existenz der Zymase« habe ich vor drei Jahren einen Versuch veröffentlicht¹⁾, wozu nach sorgfältig getrocknete und sodann getödtete Bierhefe beim Mischen mit steriler Zuckerlösung eine beträchtliche Gährwirkung auszuüben vermag. Diese Beobachtung, ein schwer wiegendes Argument zu Gunsten der Annahme eines Gährung erregenden Enzymes in der Hefezelle und gegen die Plasmahypothese, ist jetzt durch ausführlichere

¹⁾ Diese Berichte 30, 1112.

Versuche bestätigt und das Gährung erregende Agens aus den getödteten Hefezellen mit Glycerin-Wasser extrahirt worden. Beträchtliche Mengen von Hefe (je 150 g) wurden hierzu in einem grossen Vacuum-trockenapparat mit Warmwasserheizung von oben und unten, den mein College, der Physiologe N. Zuntz, freundlichst zur Verfügung stellte, 2½—4 Stdn. bei Temperaturen von 35—100° und 30 mm Druck getrocknet, hierauf durch vielständiges Erhitzen im Wasserstoffstrom [8 Stdn. auf 98—100° (Versuche I u. II), oder 4 Stdn. auf 102°. 5 Stdn. auf 110° und 10 Stdn. auf 110° (Versuch III), oder endlich 8 Stdn. auf 100—101° und sodann 10 Stdn. auf 110° (Versuche IV u. V)] getödtet und, nachdem sorgfältige Controllversuche (Aussaat grösserer Mengen in je 3 Kölbchen mit steriler Bierwürze und dreiwöchentliche Beobachtung) den sicheren Nachweis der Sterilität geliefert hatten, mit Sand und Kieselguhr unter Zusatz einer 10-procentigen, wässrigen Glycerinlösung zerrieben. Die so erhaltene, teigförmige Masse lieferte in der hydraulischen Presse einen Saft, von dem 20 ccm, versetzt mit 8 g Rohrzucker und etwas Thymol, bei 22° innerhalb 68 Stdn. bei 5 verschiedenen Versuchen 0.52, 0.74, 0.32, 0.31 und 0.51 g Kohlendioxyd entwickelten. Demnach war ¼—½ des gährkräftigen Agens, welches Presssaft aus frischer Unterhefe enthält, trotz dem Sterilisiren und trotz dem jedenfalls mit Verlusten verknüpften, darauf folgenden Extrahiren wieder in Lösung erhalten worden. Diese Versuche entscheiden, wie mir scheint, völlig gegen die Annahme von lebenden Plasmastückchen als Träger der Gährkraft im Hefepresssaft, denn lebendes Protoplasma war in der sterilisirten Hefe überhaupt nicht mehr vorhanden.

Ueber Trocknen von Hefe an der Luft, also ohne Zuhülfenahme eines heizbaren Vacuumapparates, liegen auch einige positive Versuche vor. Bei einem derselben (Versuch VI, siehe unten) wurde die von Wasser möglichst befreite Hefe zwei Tage in dünnster Schicht bei 20° auf Hürden ausgebreitet, hernach 10 Tage bei 37° getrocknet und endlich 6 Stdn. im schwachen Kohlendioxydstrom auf 97° erhitzt; 20 ccm von dem daraus gewonnenen Auszug, der genau, wie oben mitgetheilt, hergestellt wurde, lieferten, mit Zucker und Thymol (wie oben) versetzt, bei 22° nach 68 Stdn. 0.33 g Kohlendioxyd. Da indess bei diesem, zeitlich früher als die obigen angestellten Versuche die Sterilität der Hefe nach 6-stündigem Erhitzen auf 97° nicht eigens geprüft wurde, kann er nicht als entscheidend betrachtet werden; weitere Versuche darüber sind beabsichtigt.

Interesse verdient noch die nebenbei wiederholt gemachte Beobachtung, dass durch vorübergehendes, sehr gründliches Trocknen die nachfolgende Sterilisation der Hefe durch trockne Hitze ausserordentlich erschwert wird. Während früher festgestellt worden war, dass

an der Luft und hernach im Trockenschrank bei 37° getrocknete Hefe, die nach dieser Operation immer noch etwas Wasser enthält, in mit Watte verschlossenen Kolben¹⁾ durch sechstündiges Erhitzen auf 100° oder in Glasröhrchen eingeschmolzen²⁾ durch sechstündiges Erhitzen auf 95° getötet wird, zeigte sich, dass bei im Vacuum bei höherer Temperatur sehr vollständig getrockneter Hefe unter Umständen achtsündiges Erhitzen im Wasserstoffstrom auf 100° zur Sterilisation nicht genügt. Diese höhere Widerstandskraft ist wahrscheinlich nicht durch das Erhitzen im Wasserstoffstrom, also bei Luftabwesenheit, veranlasst, denn ein Controllversuch ergab, dass sorgfältig im Vacuum getrocknete Hefe auch nach achtsündigem Erhitzen auf 100° an der Luft noch lebensfähig sein kann.

Vor einem Jahre hat C. J. Lintner in München³⁾ Versuche erwähnt, bei welchen Hefe getrocknet, gemahlen und mit Wasser ausgezogen wurde. »Man erzielt ein völlig klares Filtrat, das aber keine Gährwirkung ausübt, wenigstens bei den von mir ausgeführten Versuchen. Wenn die Zymase ein löslicher Körper ist, so müsste sie sich auf die eben beschriebene Weise der Hefe entziehen lassen.« Diese Forderung des Hrn. Lintner ist nun erfüllt; die Anordnung seiner Versuche aber hat sich als ungenügend erwiesen.

Für die Ueberlassung ausgezeichneter untergähriger Bierhefe schulde ich der Schultheiss-Brauerei, Berlin, A.-G., (Laboratoriumsvorsteher Hr. Dr. Gronow) besten Dank. Mein Privatassistent, Hr. Emil Jünger mann, hat bei der Ausführung der Versuche Eifer und Geschick gezeigt.

Experimentelles.

Die viermal gewaschene und gesiebte Unterhefe wurde bei 150 Atmosphären Druck (80 kg auf 1 qm) zwei Stunden lang ausgepresst, dann 150 g der weissen, leicht zerbröckelnden Masse auf einem grossen Blech von 1/4 qm ausgebreitet und im Vacuumtrockenapparat erhitzt, wie unten näher beschrieben, wobei eine Gewichtsabnahme um 2/3 erfolgte. Die getrocknete Hefe wurde hierauf in einem Erlenmeyer-Kolben unter Ueberleiten von Wasserstoff (gewaschen mit Kalilauge, Kaliumpermanganat- und Silbernitrat-Lösung, getrocknet durch Schwefelsäure und Chlorcalcium) in einen Trockenschrank gebracht, der mit einem Mantel von siedendem Wasser, bezw. kochender Chlorcalciumlösung umgeben war; dabei entwichen auf 50 g getrocknete Hefe nochmals 1—2 g Wasser. Nachdem hierauf die Sterilität constatirt war, wurden 50 g der getöteten Hefe unter Zugabe von 100 g einer 10-procentigen wässrigen Glycerinlösung, was dem Wasserverlust

¹⁾ Diese Berichte 30, 1113.

²⁾ Diese Berichte 32, 135.

³⁾ Verhandlung, d. Ges. d. Naturforscher u. Aerzte 1899, II, 1, 166; Chemikerzeitung, Cöthen 23 (1899), 851.

beim Trocknen ungefähr entspricht, in einer Reibschale mit 150 g Quarzsand und 30 g Kieselguhr zerrieben, bis eine gleichmässig plastische Masse entstanden war; dieselbe lieferte endlich, in ein Press Tuch eingeschlagen, bei 300 Atmosphären Druck (160 kg auf 1 qcm) innerhalb zwei Stunden 45 ccm Saft.

Trocknung und Sterilisation der Hefe und Gärkraft des Auszuges.

Nr.	Hefe, getrocknet im Vacuum unter Erhitzen	Sterilisiert durch Erhitzen im H-Strom	Prüfung der Sterilität	20 ccm Saft + 8 g Rohrzucker + einige Körnchen Thymol bei 22° gaben Kohlendioxyd in g nach Stunden		
				20	44	68
I	3¼ Std. auf 35–70° ¹⁾	8 Std. auf 98°	Je drei Kölbchen mit steriler Bierwürze blieben auf grössere Aussaat hin bei Zimmertemperatur 2¼–3 Wochen steril.	0.41	0.49	0.52
II	4 Std. auf 40–80° ¹⁾	8 Std. auf 100°		0.56	0.71	0.74
III	2½ Std. auf 40–60° ¹⁾	4 Std. auf 102°, ferner 5 + 10 Std. auf 110°		0.09	0.21	0.32
IV	4 Std. auf 45–100° ¹⁾	8 Std. auf 101° und 10 Std. auf 110°		0.10	0.25	0.31
V	4 Std. auf 45–85° ¹⁾	8 Std. auf 101° und 10 Std. auf 110°		0.26	0.35	0.51
VI	An der Luft: 2 Tage bei 20°, dann 10 Tage bei 37°	6 Stunden auf 97° im CO ₂ -Strom		Nicht geprüft	0.21	0.35

- ¹⁾ Genauer, bei Versuch I: 2¼ Std. auf 35–50°, ½ Std. auf 50–60°, ½ Std. auf 60–70°;
 » » » II: ¾ Std. auf 40°, 1¼ Std. auf 50°, 1 Std. auf 60°, ½ Std. auf 70°, ½ Std. auf 80°;
 » » » III: ½ Std. auf 40°, 1¼ Std. auf 50°, ¾ Std. auf 60°;
 » » » IV: 1 Std. auf 45°, 1 Std. auf 55°, ½ Std. auf 70°, 1½ Std. auf 70–100°;
 » » » V: 1 Std. auf 45°, ½ Std. auf 50°, 1 Std. auf 70°, 1½ Std. auf 70–85°.