

**289. H. Kraut, F. Eichhorn und H. Rubenbauer: Über eine Darstellung des Hefegummi durch enzymatischen Abbau und über den Nachweis eines hefegummi-spaltenden Enzyms der Hefe.**

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 28. Mai 1927.)

Die Darstellung des Hefegummi nach E. Salkowski, die das Ausgangsmaterial der voranstehenden Untersuchung über die Reinigung des Hefegummi durch Adsorption lieferte, verwendet zur Zerstörung der Zellstruktur die Erwärmung mit 3-proz. Natronlauge. Gegen diese Behandlung ist eine Reihe von Polysacchariden empfindlich, und es erschien zweifelhaft, ob der von uns gereinigte Hefegummi nicht schon durch diesen ersten Schritt seiner Darstellung denaturiert worden war. Es gibt nun ein viel schonenderes Verfahren, den Hefegummi aus der Zelle in Freiheit zu setzen, nämlich den enzymatischen Abbau der Hefe, wie ihn R. Willstätter und F. Racke<sup>1)</sup> in der II. Abhandlung zur Kenntnis des Invertins beschreiben. Wir haben daher nach diesem Verfahren Hefegummi bereitet, durch Adsorption gereinigt und die Identität mit dem Salkowskischen, nach dem Verfahren der vorangehenden Abhandlung gereinigten festgestellt.

Überläßt man Hefe nach schonender Abtötung durch Toluol sich selbst, so geht durch das regellose Spiel der Enzyme mit dem Hefegummi allmählich die Mehrzahl der Hefe-Inhaltsstoffe in Lösung. Daher ist die totale Autolyse für die Darstellung des Hefegummi ungeeignet. Zweckmäßiger ist es, durch Abtötung eines Teiles der Hefe-Enzyme mit Essigester von 37° die Autolyse hintanzuhalten und durch Zusatz anderer Enzyme eine fraktionierte Entleerung der Hefe vorzunehmen. Willstätter und Racke haben dieses Verfahren eingeschlagen, um zu entscheiden, welcher Teilvorgang innerhalb der gesamten Autolyse die Freilegung des Invertins bewirkt. Sie fanden, daß man nach Abtötung mit Essigester von 37° die Hefe durch Pepsin oder Trypsin von fast der Hälfte der Inhaltsstoffe befreien kann, ohne daß Invertin dabei in Lösung geht. Dann läßt sich durch Diastase das Invertin zusammen mit dem Hefegummi in Freiheit setzen. Nach einer privaten Mitteilung des Hrn. Geh. Rat R. Willstätter kann man die Freilegung von Invertin und Hefegummi statt durch Diastase auch durch die pflanzliche Protease Papain bewirken.

Durch die Abtötung der Hefe mit Essigester von 37° werden ca. 25% der Trockensubstanz in Lösung übergeführt, darunter nur geringe Spuren von Hefegummi. Die folgende Verdauung mit Pepsin (auf 1 kg frischer Hefe, enthaltend 250 g Trockenhefe, ließen wir z. B. 1 g Pepsin Merck in lamellis 10 Tage bei 30° einwirken) entleerte weitere 40% des Trockengewichts aus der Hefe, darunter gar keinen Hefegummi. Die Freilegung des Hefegummi gelingt sowohl mit Papain (mit oder ohne aktivierende Blausäure<sup>2)</sup>), als auch mit Diastase.

Verdauung mit nicht aktiviertem Papain: 500 g Hefe von 117 g Trockengewicht wurden mit Essigester von 37° behandelt, zentrifugiert, der Rückstand mit Pepsin verdaut, wonach noch 40% des Trockengewichts vorhanden waren. 2.5 g Succus

<sup>1)</sup> A. 427, III [1921].

<sup>2)</sup> siehe R. Willstätter und W. Grassmann, Über die Aktivierung des Papains durch Blausäure, Ztschr. physiol. Chem. 138, 184 [1924].

Caricae Papayae entleerten daraus in 14 Tagen bei 30° 10.3 g = 9 % der Trockenhefe. Davon waren 4.5 g = 44 % Hefegummi. Der unverdauliche Rückstand enthielt noch 1.0 g Hefegummi.

Verdauung mit aktiviertem Papain: 1 kg mit Pepsin entleerter Hefe wurde mit 2 g Succus und 20 ccm 1-proz. Blausäure bei 30° 16 Tage verdaut. Es gingen 19 g = 8 % der Trockenhefe in Lösung. Sie enthielten 5.5 g = 29 % Hefegummi. Im unverdaulichen Rückstand befanden sich 4.4 g Hefegummi.

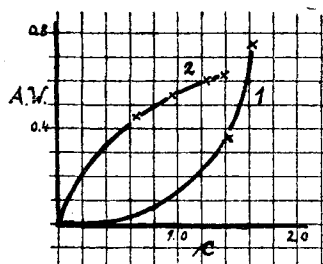
Verdauung mit Diastase: Käuflichen diastatischen Malzextrakt befreiten wir durch 8-tägige Dialyse gegen fließendes Wasser von der großen Menge begleitender Kohlehydrate. Wir versetzten 500 g pepsin-verdaute Hefe mit dem dialysierten Malzextrakt, der 12.5 g Trockensubstanz enthielt. Durch die Verdauung vermehrte sich das Trockengewicht um 7.8 g = 6 % der Trockenhefe, wovon 5.5 g = 70 % Hefegummi waren. Der Rückstand war frei von Hefegummi.

Es ist auffallend, daß vom aktivierten Papain weniger Hefegummi, ja sogar insgesamt weniger Trockensubstanz in Freiheit gesetzt wird, als von Papain ohne Blausäure. Dieses Ergebnis spricht für eine Mitwirkung von überlebenden Hefe-Enzymen, da man die schlechtere Freilegung durch das weit stärker (nämlich auch Peptone) spaltende System Papain + Blausäure wohl nur mit der Vergiftung von Hefe-Enzymen durch die Blausäure erklären kann. Während Willstätter und Racke wegen der geringen Beständigkeit des Invertins 37° bei der Abtötung der Hefe mit Essigester nicht überschreiten konnten, waren wir in der Lage, Verdauungsversuche nach vollständiger Abtötung aller Hefe-Enzyme durch 1-stdg. Kochen der Hefe mit Essigester vorzunehmen. Sie zeigten das interessante Resultat, daß nun Pepsin überhaupt nicht mehr verdaute. Papain setzte 40 % der Trockensubstanz in Freiheit, immerhin viel weniger als bei noch vorhandenen Hefe-Enzymen von Pepsin und Papain zusammen herausgelöst wird. Diastase konnte aus der gesamten, mit siedendem Essigester getöteten Hefe kaum so viel Trockensubstanz herausholen, als vorher aus der zu  $\frac{3}{4}$  entleerten. In den gewonnenen Extrakten fand sich aber nur sehr wenig Hefegummi; noch relativ am meisten setzte Papain in Freiheit, nämlich 5 % des in der frischen Hefe bestimmten Gummis. Diese Versuche beweisen die Mitwirkung überlebender Hefe-Enzyme bei der Auflösung der bei 37° mit Essigester abgetöteten Hefe. Der Vorgang der Freilegung von Invertin und von Hefegummi ist kompliziert und läßt sich nicht allein als Proteolyse oder Amylolyse auffassen.

Aus den durch den enzymatischen Abbau der Hefe gewonnenen Hefegummi-Lösungen gelang es ohne Anwendung von Säure oder Alkali, die bei der Fällung mit Fehlingscher Lösung unvermeidlich sind, alle Verunreinigungen abzutrennen. Die niedrig molekularen Begleiter entfernten wir durch Alkohol-Fällung und Dialyse mittels Fischblasen, die wir durch eine mehrstündige Elektrodialyse vervollständigten. Dabei fiel ein Teil der Eiweißstoffe aus und wurde abfiltriert. Lösungen, die wir durch Verdauung mit Papain gewonnen hatten, bestanden nun zu etwa 60 % des Trockengewichtes, die mit Diastase hergestellten zu etwa 50 % aus Hefegummi. Erstere erwiesen sich als geeigneter für die Reinigung, die in der Adsorption der Verunreinigungen an Kaolin und Tonerde bestand.

Nach 6-maliger Voradsorption mit kleinen Kaolin-Mengen (auf 7 g Trockensubstanz 60 g, 50 g, 30 g, 20 g, 12 g und 8 g Kaolin in schließlich 600 ccm) zeigte die Restlösung der Papain-Verdauung eine Tonerde-Adsorptionskurve (Nr. 1 der Figur) mit plötzlichem, steilem Anstieg der Ad-

sorptionswerte bei der Konzentration von 1.4 g Hefegummi im Liter oder bei der Adsorption von 30% des angewandten Hefegummis. Aus dem Verlauf dieser Kurve war zu entnehmen, daß eine



Adsorption an Aluminiumhydroxyd eine starke Fraktionierung des Gemisches bringen werde, die wir 2-mal mit kleinen Adsorbensmengen durchführten (je 0.025 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  auf 0.5 g Trockensubstanz). In der Tat erwies sich die aus der neuen Restlösung aufgenommene Adsorptionskurve an Tonerde als die normale Isotherme (Nr. 2 der Figur). (Ausbeute aus 8 g in der verdauten Lösung enthaltenem 3 g reiner Hefegummi = 37.5%.)

Figur: Adsorptionskurven von Hefegummi-Präparaten aus papain-verdauter Hefe an Aluminiumhydroxyd. 1. Nach Voradsorption mit Kaolin. 2. Nach Voradsorption mit Tonerde.

|               | angewandte Mengen |                           | Vol. | adsorb. |       |      |
|---------------|-------------------|---------------------------|------|---------|-------|------|
|               | g Hfg.            | g $\text{Al}_2\text{O}_3$ | ccm  | g Hfg.  | A.-W. | c    |
| Kurve 1 ..... | 0.100             | 0.078                     | 50   | 0.029   | 0.37  | 1.42 |
|               | 0.100             | 0.026                     | 50   | 0.019   | 0.75  | 1.61 |
| Kurve 2 ..... | 0.077             | 0.104                     | 50   | 0.045   | 0.43  | 0.64 |
|               | 0.077             | 0.052                     | 50   | 0.028   | 0.54  | 0.98 |
|               | 0.077             | 0.026                     | 50   | 0.015   | 0.60  | 1.23 |
|               | 0.077             | 0.013                     | 50   | 0.008   | 0.61  | 1.38 |

Beim Vergleich dieser Kurve mit der Adsorptions-Isotherme des gereinigten Salkowskischen Hefegummis (Kurve Nr. 2 der Fig. 1 der voranstehenden Abhandlung) fallen die weit höheren Adsorptionswerte der letzteren auf. Man könnte daraus folgern, daß der durch enzymatischen Abbau dargestellte Hefegummi von dem Salkowskischen verschieden sei. Indessen unterscheiden sich die beiden Kurven nur durch einen konstanten Faktor; durch Multiplikation mit 2.8 fallen die niedrigeren Adsorptionswerte alle genau in den Verlauf der anderen Kurve. Nach W. Mecklenburg<sup>3)</sup> sind derartige affine Adsorptionskurven ein Zeichen dafür, daß die beteiligten Stoffe sich bei chemischer Identität durch ihren Dispersitätsgrad unterscheiden. Beide Kurven sind mit demselben Präparat des Ortho-aluminiumhydroxyds aufgenommen worden, allerdings mit einem Abstand von 8 Monaten. Man kann annehmen, daß in dieser Zeit die Tonerde durch Teilchenwachstum an Adsorptions-Tüchtigkeit verloren hat; wahrscheinlicher ist, daß der Hefegummi durch die beiden Methoden zwar als dasselbe chemische Individuum, aber von verschiedenem Dispersitätsgrad gewonnen wird. Die Identität der nach beiden Verfahren gewonnenen reinen Präparate beweist außerdem die Gleichheit der Drehungswinkel, die übereinstimmend zu 88.8° gefunden wurden.

Die Darstellung des Hefegummis durch enzymatischen Abbau der Hefe ergab noch ein überraschendes Resultat. Die Ausbeuten an Hefegummi in den Lösungen und die im Unverdaulichen verbliebenen Mengen betragen nämlich zusammen viel weniger, als man nach Salkowskis Methode aus derselben Hefe isolieren kann. Es muß angenommen werden, daß in der

<sup>3)</sup> Ztschr. physikal. Chem. 88, 609 [1913].

Hefe ein bisher unbekanntes hefegummi-spaltendes Enzym vorhanden ist, das nach Abtötung der Hefe mit Essigester von 37° noch seine Wirksamkeit entfaltet. Zum Nachweis dieses Enzyms haben wir die Veränderungen des Hefegummi-Gehaltes durch enzymatische Vorgänge in der abgetöteten Hefe verfolgt. Daß die lebende Hefe imstande ist, beim Hungern den Hefegummi zu vermindern, ist schon von J. Warkany<sup>4)</sup>, allerdings mit unzulänglicher Bestimmungsmethode, nachgewiesen worden. Nach einem besonderen hefegummi-spaltenden Enzym hat er aber nicht gesucht.

Man bestimmt zweckmäßig den Hefegummi-Gehalt einer Hefeprobe nach Zerstören der Struktur mit 3-proz. warmer Natronlauge durch Ausfällen des Hefegummi mit Fehlingscher Lösung, Lösen in wenig Salzsäure, Fällen mit der 5-fachen Menge absol. Alkohol und Polarisation des wieder aufgelösten Gummis. Die Bestimmung ist durch die optisch aktiven Verunreinigungen beeinträchtigt, gibt aber doch ein genügendes Maß des vorhandenen Gummis. Wiederholungen derselben Bestimmung differierten um weniger als 2%.

Bei zahlreichen Versuchen fanden wir in 100 g frischer Löwenbräu-Hefe 1.72—1.74 g Hefegummi (siehe Tabelle). Tötet man die Hefe mit Essigester von 37°, so bleibt der Hefegummi-Gehalt innerhalb von 3 Tagen bei 30° unverändert. Setzten wir aber dem abzentrifugierten Niederschlag Pepsin oder Papain zu, so konnten wir nach 3 Tagen nur noch 1.38—1.49 g Hefegummi nachweisen. 14—20% des Hefegummis waren also verschwunden. Innerhalb von weiteren 5 Tagen änderte sich der Hefegummi-Gehalt nicht mehr merklich. Wenn man den Essigester bei Zimmer-Temperatur verwendet statt bei 37°, so tritt auch ohne Zusatz von Enzymen eine geringe Abnahme des Hefegummis ein (von 1.73 g auf 1.55 g).

Bewirkt man die Abtötung der Hefe durch Toluol bei Zimmer-Temperatur oder bei 37°, so beginnt sofort die Autolyse. Dabei nimmt der Hefegummi innerhalb von 3 Tagen auch ohne Zusatz von Papain oder Pepsin um 16—17% ab. Zusatz von Pepsin oder Papain ist nun nicht mehr imstande, den Hefegummi-Gehalt weiter zu verringern. Die größte Abnahme beobachteten wir bei einem Versuch der totalen Autolyse ohne Zusatz eines Antiseptikums. Nach 20 Tagen fanden sich nur noch 40% des ursprünglich vorhandenen Hefegummis.

Man muß aus diesen Beobachtungen schließen, daß das hefegummi-spaltende Enzym in besonderer Weise verankert und vom Hefegummi selbst getrennt ist. Es wird durch bestimmte Vorgänge innerhalb der Autolyse oder Plasmolyse freigelegt. Darauf beruht es auch, daß wir auf keine Weise imstande waren, das Enzym aus der abgetöteten Hefe zu isolieren. Hefegummi wird weder von frischem Toluol-Autolysat, noch von Extrakten aus Lebedewscher Trockenhefe oder ausgefrorener Hefe hydrolysiert, auch wenn bei der Einwirkung, wie bei der Extrakt-Gewinnung die Wasserstoff-Ionen-Konzentration durch Puffer-Zusatz weitgehend variiert wurde. Aus dem Versuch der totalen Autolyse ohne Zusatz eines Antiseptikums kann man vielleicht schließen, daß in der noch wenig veränderten Zelle überhaupt nur ein Teil des Hefegummis (höchstens 20%) dem Angriff des Enzyms zugänglich ist. Erst die völlige Zerstörung der Zellstruktur würde dann eine weitere Verminderung des Hefegummi-Gehaltes ermöglichen.

Nach der Auffindung dieses Enzyms der Hefe haben wir noch einige andere Quellen kohlehydrat-spaltender Enzyme untersucht, konnten aber weder durch Taka-Diastase

<sup>4)</sup> Biochem. Ztschr. **150**, 271 [1924].

oder Emulsin, noch durch die Auszüge aus *Aspergillus niger*, Grünmalz oder Darmmalz eine Spaltung des Hefegummis bewirken.

Tabelle: Wirksamkeit der Hefe-Gummase.

Alle Bestimmungen sind mit Extrakten aus 100 g frischer Hefe nach 3-tägigem Stehen bei 30° ausgeführt. 100 g frische Hefe enthalten 1.72—1.74 g Hefegummi.

| Hefe-Lieferung                                      | Vorbehandlung                                 | noch vorhand. g Hefegummi | Abnahme in % |
|---|---|---------------------------|--------------|
| Nr. 1   | mit Toluol 1 Stde. bei 37° verflüssigt .....  | 1.46                      | 16           |
| „   | „ „ 1 „ „ 37° „ .....                         | 1.43                      | 17           |
| „   | „ „ bei gew. Temp. „ .....                    | 1.43                      | 17           |
| „   | Essigester 1 Stde. bei 37° verflüssigt .....  | 1.66                      | 4            |
| „   | „ „ 1 „ „ 37° „ .....                         | 1.63                      | 5            |
| „   | „ „ bei gew. Temp. „ .....                    | 1.55                      | 10           |
| „ 2   | „ Toluol bei gew. Temp. verflüssigt und       |                           |              |
|   | a) mit 0.2 g Pepsin versetzt .....            | 1.46                      | 16           |
|   | b) „ 0.2 g Papain „ .....                     | 1.57                      | 9            |
| „ 3   | mit Essigester bei gew. Temp. verflüssigt und |                           |              |
|   | a) mit 0.4 g Pepsin versetzt .....            | 1.43                      | 17           |
|   | b) „ 0.4 g Papain „ .....                     | 1.46                      | 16           |
| „ 4   | mit Essigester von 37° verflüssigt und        |                           |              |
|   | a) mit 0.4 g Pepsin versetzt .....            | 1.49                      | 14           |
|   | „ 0.4 g „ „ .....                             | 1.43                      | 17           |
|   | b) „ 0.4 g Papain „ .....                     | 1.43                      | 17           |
|   | „ 0.4 g „ „ .....                             | 1.38                      | 20           |
| totale Autolyse ohne Zusatz, nach 20 Tagen bestimmt |   | 0.70                      | 60           |

## 290. C. Paal und Charlotte Auerswald: Über das Hydrosol des Platinwasserstoffs und seine Dehydrogeni- sation durch metallisches Quecksilber.

[Aus d. Laborat. für angewandte Chemie u. Pharmazie d. Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 22. Juni 1927.)

Wie der eine von uns in Gemeinschaft mit W. Hartmann<sup>1)</sup> vor längerer Zeit beobachtet hat, wird das nach dem Verfahren von Paal und Amberger<sup>2)</sup> dargestellte Palladiumhydrosol bei längerer Berührung mit metallischem Quecksilber oder Quecksilberhydrosol inaktiv. Das Quecksilber wird hierbei vom Palladiumhydrosol aufgenommen und das so entstandene Palladium-amalgam-Hydrosol vermag gasförmigen Wasserstoff nicht mehr zu adsorbieren, im Gegensatz zum ursprünglichen Palladiumhydrosol, das nach Versuchen von Paal und Gerum<sup>3)</sup> weit mehr als das Tausendfache an Wasserstoff, auf 1 Vol. Pd bezogen, adsorbiert. Wie Paal und H. Steyer<sup>4)</sup> zeigen konnten, gibt das durch Behandlung mit gasförmigem Wasserstoff entstandene Palladiumwasserstoff-Hydrosol beim Schütteln mit metallischem Quecksilber oder Quecksilberhydrosol in einer Wasserstoff-Atmosphäre den adsorbierten Wasserstoff wieder ab, dessen Volumen gemessen wurde. In drei Versuchen wurde ge-

<sup>1)</sup> B. 51, 711 [1918].

<sup>2)</sup> B. 37, 124 [1904], 38, 1398 [1905].

<sup>3)</sup> B. 41, 805 [1908].

<sup>4)</sup> B. 51, 1743 [1918].