543. A. Wróblewski: Zusammensetzung des Buchner'schen Hefepresssaftes¹⁾.

[Vorgelegt der Academie der Wissenschaften in Krakau am 7. November 1898.
Autoreferat.]

(Eingegangen am 6. December.)

Der Hefepresssaft stellt eine angenehm, intensiv hefeartig, dabei etwas scharf und schwach säuerlich riechende, dickliche Flüssigkeit dar, welche eine mehr oder weniger dunkle, bräunliche Farbe besitzt. Sie erscheint im durchfallenden Lichte klar, mit einer sehr schwachen Opalescenz und im auffallenden Lichte stark bläulichgrau fluorescirend. Der Hefesaft besitzt einen süsslichen, zusammenziehenden, scharfen, gewürzähnlichen, pikanten Geschmack. Er enthält zahlreiche Stoffe in der Lösung, deren Hauptmenge Proteinstoffe bilden.

Proteinstoffe. Unter den Proteinstoffen des Hefesaftes sind einige Fermente befindlich. Ausser dem Invertin enthält er noch ein proteolytisches Ferment, dessen Anwesenheit von M. Hahn nachgewiesen und dessen Wirkung von L. Geret und M. Hahn vor Kurzem beschrieben wurde²⁾. Gewisse Beobachtungen, welche ich nachher zu beschreiben gedenke, sprechen dafür, dass das Invertin und das proteolytische Ferment in denjenigen Fällungen des Saftes zu suchen sind, welche die Proteosen enthalten.

Unter den Fermenten des Saftes sollen nach Buchner auch Oxydasen vorhanden sein³⁾. Es scheint aber, dass noch zu wenige Beweise dafür erbracht sind. Der frische Saft, welcher eine schwach alkalische Reaction besitzt, wird an der Luft allmählich amphoter, dann sauer und dunkler. Er enthält eine stark reducirende Substanz, welche, wie schon von anderen Forschern beobachtet wurde, den Schwefel zu Schwefelwasserstoff reducirt. Dieselbe Substanz reducirt auch Jod zu Jodwasserstoff, was bei meinen Bestrebungen, die Anwesenheit des diastatischen Enzymes nachzuweisen, störend wirkte. Ich versetzte 5 ccm des Saftes mit ein wenig löslicher Stärke, nach dem vierstündigen Digeriren bei 38° gab die Lösung mit Jod keine Trübung, reducirte aber die Fehling'sche Lösung (nach der Entfernung der Eiweissstoffe) nur sehr schwach. Es hat sich erwiesen, dass auch die frische Mischung keine Blaufärbung mit Jod gab. Wenn man Krystalle von Jod hineinwarf, so bildete sich auf dem Boden des Gläschens um dieselben eine blaue Schicht, die beim

¹⁾ Vergl. A. Wróblewski, »Gährung ohne Hefezellen«. Centrabl. f. physiol. Chem. 12, No. 21.

²⁾ Diese Berichte 31, 2335.

³⁾ Oesterr. chem. Ztg. No. 7.

Umschwenken verschwand. Wenn man zu dem mit löslicher Stärke digerirten Saft einen grossen Ueberschuss von Jodlösung zusetzte, so färbte sich die Flüssigkeit prachtvoll blau, was beweist, dass die lösliche Stärke nicht gespalten wurde. Die Anwesenheit eines stärke-spaltenden Fermentes wurde demnach nicht nachgewiesen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es der reducirende Körper ist, welcher den Sauerstoff aus der Luft absorbirt, dabei sich bräunt und in eine sauer reagirende Verbindung übergeht. Es wurde aber noch nicht festgestellt, ob der reducirende Körper für eine Oxydase zu halten ist.

Die Zymase ist wahrscheinlich unter den coagulirbaren Eiweissstoffen zu suchen, wie es aus dem näheren Studium der letzteren zu folgen scheint.

Der Hefepresssaft enthält mehrere coagulirbare Eiweissstoffe, wie man mit Hülfe einer Methode der partiellen Coagulation constatiren kann. In der folgenden Tabelle (S. 3220 und 3221) sind die charakteristischeren Versuchsergebnisse angeführt.

Wir ersehen aus der Tabelle vor Allem, dass im Presssaft mehrere coagulirbare Proteinstoffe sich befinden, von denen die bei 41°, 51°, 56°, 59°, 62°, 68° coagulirenden beachtenswerther sind. Der erste Proteinstoff wird auch durch Aether bei 35° coagulirt. Denselben Effect übt Aether auch bei gewöhnlicher Temperatur nach mehrstündiger Einwirkung aus. Dieser Proteinstoff enthält in seinem Molekül Schwefel, er wird durch Säuren gefällt, der Niederschlag löst sich in Alkalien. Er löst sich nach der Coagulation in Wasser nicht, wohl aber in Alkalien und wird aus dieser Lösung durch Säuren gefällt; ähnliches Verhalten zeigen auch andere coagulirte Eiweissstoffe, welche ebenfalls Schwefel in ihrem Molekül enthalten. Der bei 41° coagulirende Eiweissstoff filtrirt durch die Chamberland-Kerze nicht, und das Filtrat, welches die übrigen Proteinstoffe enthält, ist nicht opalisirend, fluorescirt nur schwach und vergäht den Zucker so gut wie garnicht, enthält aber die reducirende Substanz. Demnach musste die Zymase bei der Filtration bei dem bei 41° coagulirenden Eiweissstoffe bleiben. Ich will hier ausdrücklich betonen, dass es noch verfrüht ist, diesen oder jenen Körper mit der Zymase zu identificiren. Es ist noch nicht aufgeklärt, ob dieser, wahrscheinlich complicirt gebaute Eiweissstoff, im Presssaft in der wahren oder nur in der scheinbaren Lösung sich befindet.

Beim Stehenbleiben des Saftes scheint durch die Wirkung des proteolytischen Enzymes der bei 41° coagulirende Eiweissstoff vor allen anderen verdaut zu werden; die widerstandsfähigsten scheinen die bei 51°, bei 56° und bei 59° coagulirenden zu sein.

No. des Versuches	Bemerkungen:	Bei der Tem-										
		40 $\frac{1}{2}$ °	41°	42°	47 $\frac{1}{2}$ °	50 $\frac{1}{2}$ °	51°	52°	54°	56°	59°	60°
I	Frischer Saft	Trüb.	vol. Nied.		Nied.	Trüb.	vol. Nied.			vol. Nied.	vol. Nied.	kl. fas. Nied. u. flock. Nied.
II	1 Tag nach Auspressen		vol. Nied.		klein. Nied.	Trüb.	vol. Nied.			vol. Nied.	vol. Nied.	kl. fas. Nied. u. flock. Nied.
III	Unwirksamer Presssaft aus der Handelshefe			vol. Nied.			vol. Nied.			Nied.	vol. Nied.	kl. fas. Nied. u. kl. flock. Nied.
IV	Mit Essigsäure gefällter und neutralisirter Saft						vol. Nied.		klebrige Fasern			
V	Durch die Chamberland-Kerze filtrirter Saft					Trüb.		vol. Nied.		vol. Nied.		
VI	Vier Tage nach Auspressen						vol. Nied.			Nied.	vol. Nied.	
VII	Sechs Tage nach Auspressen						vol. Nied.			kl. Nied.	Nied.	

peratur von:

62°	63°	68°	71°	72°	74°	81°	82°	84°	89°	91°	95°	99°	Siedetem- peratur
kl. fas. Nied. u. flock. Nied.	kl. Nied.	vol. Nied.	schw. Nied.	kl. Nied.		schw. Trüb.			kl. Nied.		sehr kl. Nied.	sehr kl. Nied.	sehr kl. Nied.
kl. fas. Nied. u. kl. flock. Nied.	kl. Nied.	Nied.		kl. Nied.		Trüb.			sehr kl. Nied.		sehr kl. Nied.	sehr kl. Nied.	sehr kl. Nied.
kl. fas. Nied. u. kl. flock. Nied.	kl. Nied.	fas. Nied.		kl. Nied.			Trüb.		kl. Nied.			sehr kl. Nied.	sehr kl. Nied.

Schwache Trübung mit wenigen Fasern

vol. Nied.		vol. Nied.		kl. Nied.	kl. Nied.			kl. Nied.			kl. Nied.	sehr kl. Nied.	sehr kl. Nied.
kl. fas. Nied. u. flock. Nied.	Trüb. die bei Schütt. theilw. in Fasern	Trübung		kl. fas. Nied.						kl. Nied.			sehr kl. Nied.
kl. fas. Nied.										sehr kl. Nied.			sehr kl. Nied.

Ein Versuch der partiellen Aussalzung hat mich zu folgendem interessanten Schlusse geführt. Nach dem Mischen von 3.8 Volumtheilen des Saftes mit 6.2 Volumtheilen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung, fallen die über 60° coagulirenden Eiweissstoffe nieder, die unter 60° coagulirenden bleiben in der klaren Lösung, darunter auch der bei 41° coagulirende. Dieser Umstand scheint doch dafür zu sprechen, dass dieser Eiweissstoff sich im Saft nicht lediglich in einem gequollenen oder suspendirten Zustande befindet, weil er in solchem Falle ausgefällt werden müsste. Beim Sättigen des Filtrates mit Ammoniumsulfat fallen die übrigen coagulirenden Eiweissstoffe nieder, daneben auch kleine Mengen der Proteosen. Bei der Dialyse des klaren Saftes fallen Globuline in voluminösen Flocken aus. Nach dem Filtriren und Auswaschen mit Wasser lösen sie sich in einer 10-proc. Kochsalzlösung auf; die klar filtrirte Lösung trübt sich bei grossem Zusatz von Wasser, wie auch beim Sättigen mit Natriumchlorid, sie coagulirt bei Erwärmen. Es wurde leider noch nicht ermittelt, welchen Eiweissstoffen der angeführten Tabelle diese Globuline entsprechen. Im Filtrate von den im Dialysator gefällten Globulinen erzeugen Säuren einen voluminösen Niederschlag. Bei der Aussalzung mit Ammoniumsulfat des nach der Coagulation der Eiweissstoffe erhaltenen Filtrates wird nur ein sehr kleiner Niederschlag erhalten, und deshalb wurde, um die restirenden Proteinstoffe zu fällen und um den Salzzusatz zu vermeiden, Alkohol im Ueberschusse zugesetzt. Der Alkoholniederschlag wurde in zwei Fractionen erhalten; die erste wurde durch Zusatz von zwei Volum Alkohol niedergeschlagen, das Filtrat davon eingengt und mit dem Ueberschusse von absolutem Alkohol unter Zusatz von Aether die zweite Fraction gefällt.

Diese Fractionen wurden durch Lösen im Wasser und Füllen mit Alkohol gereinigt. Beim Lösen der ersten Fraction in Wasser blieb ein Theil ungelöst. Dieser unlösliche Theil stellt eine sehr eigenthümlich krystallisirende Substanz dar, welche beim Verbrennen sich vollständig schwärzt, verkohlt und dann viel Asche zurücklässt. Die Asche enthält ziemliche Mengen von Phosphorsäure und Calcium, ausserdem ansehnliche Mengen von Sulfiden, weil sie mit Salzsäure Schwefelwasserstoff entwickelt. Diese eigenthümliche Substanz wurde bis jetzt noch nicht näher untersucht. Die erste Fraction enthielt ein Kohlenhydrat, welches mit Kupfersulfat einen in Natronlauge unlöslichen, bläulichen Niederschlag gab und Fehling'sche Lösung erst nach anhaltendem Kochen mit Säuren reducirte. Eine solche mit Schwefelsäure gekochte Lösung des Kohlenhydrats gab die gewöhnlichen Zuckerreactionen. Das zusammengesetzte Kohlenhydrat und der aus ihm entstehende Zucker sind bis jetzt nicht näher untersucht worden. Die erste Fraction enthielt neben diesem Kohlen-

hydrate noch kleine Mengen Proteosen und grössere Mengen Peptone. Die zweite Fraction bestand hauptsächlich aus Peptonen. Die beiden Fractionen stellen nach dem Auswaschen mit Alkohol und Aether sehr hygroskopische, an der Luft zerfliessende Pulver dar, insbesondere die zweite Fraction. Die erste ist schneeweiss, die zweite schwach gelblich. Bei dem Auswaschen der zweiten Fraction mit Alkohol und Aether treten ernste Schwierigkeiten auf, weil die Substanz auch mit Aether eine milchige, durch die Filterporen dringende Mischung bildet. Die Lösungen der beiden Fractionen geben die folgenden Reactionen.

(Hier folgt Tabelle S. 3224.)

Fraction I scheint noch Proteosen zu enthalten. Das Verhalten der Fraction II entspricht dagegen einem Gemenge der Peptone A und B von Pick¹⁾).

Die übrigen Bestandtheile des Hefepresssaftes. Ausser den Proteinstoffen sind im Presssaft noch die erwähnte reducirende Substanz und ein Kohlenhydrat vorhanden. Eine oft bei den Versuchen auftretende Entfärbung der Fehling'schen Lösung ohne Erzeugung eines Niederschlages, welche schon Salkowski im Hefeauszuge beobachtet hatte²⁾, scheint von der erwähnten reducirenden Substanz herzustammen. Diese Substanz, welche auch ammoniakalische Silberlösung reducirt, ist in Alkohol löslich und mit Aether fällbar.

Wenn man die von den Peptonen abfiltrirte alkoholische Lösung zur Trockne abdampft und mit einem Gemische von gleichen Volumen Aether und Alkohol absolutus auszieht, den Rest in Wasser löst und im Exsiccator auskrystallisirt, so entstehen bald Tyrosinkrystalle, die sich nach bekannten Methoden reinigen und charakterisiren lassen. Aus den Mutterlaugen lassen sich Leucin und Glutaminsäure isoliren und durch ihre wichtigsten Reactionen charakterisiren. Es scheinen in den Mutterlaugen noch andere Amidosäuren zu bleiben.

In dem erwähnten ätherisch-alkoholischen Auszuge sind Glycerin und Lecithin nachgewiesen worden. Das Glycerin ist durch die ölige Consistenz, süsslichen Geschmack, Flüchtigkeit bei der Temperatur von 110° bis 120° und die Acroleinreaction charakterisirt worden. Das Lecithin wurde durch den Gehalt an Phosphorsäure erkannt. Ausserdem sind noch in alkoholischer Lösung einige andere, nicht charakterisirte Körper von besonderen Krystallformen beobachtet worden. Dazu ist der oben erwähnte, eigenthümlich krystallisirende, mit Alkohol fällbare Körper zuzurechnen.

Alkalien fallen im Saft Calcium- und Magnesium-Phosphate.

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 246.

²⁾ Ueber Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe. Ibid. 13, 206.

Reagens	Fraction I	Fraction II
Salzsäure	fällbar	nicht fällbar
Alkohol	fällbar	sehr schwer fällbar
Kupfersulfat	bläulicher Niederschlag, der in Natronlauge und Fehling'scher Lösung unlöslich ist	kein Niederschlag
Biuretprobe	undeutlich	schöne Rosafärbung
Xanthoprotein- reaction	sehr schwach	intensiv schon in der Kälte
Millon's Reagens	negativ	negativ
Sublimat	sehr schwache Trübung, die in der Kochsalzlösung löslich ist	sehr schwache Trübung, die in der Kochsalzlösung löslich ist
Bleieessig	starke Fällung	starke Fällung
Bleizucker	starke Fällung	starke Fällung
Silbernitrat	Fällung in NH_3 löslich	Fällung in NH_3 löslich
Ferrocyankalium + Essigsäure	keine Fällung	keine Fällung
Phosphorwolfram- säure	Fällung	volum. Fällung
Barythydrat	Fällung, im Ueberschusse unlöslich	Fällung, im Ueberschusse unlöslich
Gerbsäure	volum. Fällung, die beim Erwärmen ver- schwindet, beim Erkalten wieder erscheint	volum. Fällung, die beim Erwärmen ver- schwindet, beim Erkalten wieder erscheint
Pikrinsäure	nach längerer Zeit schwache Fällung	keine Fällung
Metaphosphorsäure	Trübung, die beim Erwärmen verschwindet, beim Erkalten wieder erscheint	keine Fällung
Kaliumquecksilber- jodid	Fällung nur in saurer Lösung	Fällung nur in saurer Lösung
Trichloressigsäure	Fällung, die beim Erwärmen verschwindet, beim Erkalten wieder erscheint	keine Fällung
Kochen mit Bleiace- tat und Natronlauge	negativ	negativ
Reaction von Adamkiewicz	sehr schwach	negativ
R. von Lieber- mann	negativ	Rosafärbung
Lugol'sche Lösung	Fällung	Fällung
Molisch'sche Probe	violette Färbung	violette Färbung

Wenn man den von den coagulirbaren Eiweissstoffen befreiten Presssaft mit Aether extrahirt und den Aether bei niedriger Temperatur verdunsten lässt, so erhält man eine kleine Menge einer scharf aromatisch riechenden, klaren, farblosen, leicht flüchtigen Flüssigkeit, die saure Reaction besitzt und, auf die Zunge genommen, sehr stark brennt. Sie hinterlässt auf dem Papier durchsichtige Flecken.

Aus der vorliegenden Mittheilung ist ersichtlich, aus wie zahlreichen Bestandtheilen eine Zellenblase bestehen kann.

K. k. allg. Untersuchungs-Anstalt für Lebensmittel in Krakau.

544. Julius Schmidt: Ueber isomere Benzoyl-acetoxime.

(Vorläufige Mittheilung.)

[Aus dem chemischen Institut der Universität Jena.]

(Eingegangen am 28. December.)

Man hat bei den Oximen der aromatischen Reihe und auch bei einzelnen der Fettreihe feinere Isomeriefälle beobachtet, welche theils auf räumliche Verhältnisse, theils aber auch auf verschiedene Structur der Oximidogruppe zurückzuführen sind.

Insbesondere aus aromatischen Oximen sind isomere *Alkyl*derivate erhalten worden, deren Isomerie sicher darauf beruht, dass der Alkylrest in einem Falle an Sauerstoff, im anderen Falle an Stickstoff gebunden ist:

Derartige structurisomere *Acyl*derivate von Oximen sind meines Wissens noch nicht bekannt¹⁾.

A. Janny²⁾ hat durch Erwärmen von Acetoxim mit Benzoylchlorid einen bei 41—42° schmelzenden Benzoylester des Acetoxims dargestellt.

Durch Einwirkung von Benzoylchlorid auf das Natriumsalz des Acetoxims konnte ich ausser dieser von Janny beschriebenen, *festen* Benzoylverbindung ein *flüssiges* Isomeres derselben gewinnen.

¹⁾ Die isomeren aromatischen Aldoxime liefern je zwei Acetyler, welche nach Hantzsch stereoisomer sind.

²⁾ Diese Berichte 16, 170.