

säure und das Platinsalz der gebildeten Base, schöne gelbe, schwer lösliche Kryställchen, zeigte den Schmp. 244^o und den Platingehalt der γ -Phenylchinolinverbindung.

Analyse: Ber. für $(C_{15}H_{11}N, HCl)_2PtCl_4$.

Procente: Pt 23.72.

Gef. » » 23.81.

215. C. J. Lintner und E. Kröber: Zur Kenntniss der Hefeglycase.

(Eingegangen am 1. Mai.)

Emil Fischer¹⁾ hat bekanntlich gezeigt, dass Maltose durch Hefeauszug in Glycose gespalten werden kann. Die gleiche Beobachtung hat der Eine²⁾ von uns schon früher gelegentlich von Versuchen über die Vergährbarkeit der Isomaltose gemacht und dann später anknüpfend an dieselben die Ansicht³⁾ ausgesprochen, dass das Maltose spaltende Enzym nicht identisch sei mit Invertin, sondern möglicherweise der Glycase näher stehe. In ähnlicher Weise, jedoch bestimmter, insofern er das fragliche Enzym mit der Glycase idendificirte, sprach sich Röhmann⁴⁾ aus. Emil Fischer, der schon in seiner ersten Mittheilung die Möglichkeit einer Verschiedenheit des maltosespaltenden Enzyms und des Invertins ins Auge gefasst hat, weist eine solche in der zweiten Mittheilung⁵⁾ bestimmt nach. Den Hauptbeweis dafür erblickt er in dem Umstande, dass beim Auslaugen der frischen Hefe mit Wasser nur das Enzym in Lösung geht, welches den Rohrzucker spaltet, das Invertin. Die Annahme Röhmann's, dass das maltosespaltende Enzym mit der im Mais enthaltenen Glycase identisch ist, bezeichnet er als verfrüht. Zur Unterscheidung des ersteren Enzymes von anderen »glycasischen« schlägt er die Bezeichnung »Hefeglycase« vor. Die unten mitgetheilten Versuche zeigen nun, dass in der Hefeglycase thatsächlich ein von der Maisglycase und dem Invertin verschiedenes Enzym vorliegt; denn während nach Kjeldahl⁶⁾ für das Invertin das Temperaturoptimum bei 52—53^o und für Glycase nach Geduld⁷⁾ bei 57—60^o liegt, ergab sich für das Maltose invertirende Enzym, dass sein Optimum weit niedriger, bei etwa 40^o liegt. Dass bei einer

¹⁾ Diese Berichte 27, 2988.

²⁾ Z. f. ges. Brauwesen 1892, 106.

³⁾ ebenda 1894, 414.

⁴⁾ Diese Berichte 27, 3479.

⁵⁾ Diese Berichte 27, 3251.

⁶⁾ Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet 3, 1881 186; Z. f. ges. Brauw. 1881, 457.

⁷⁾ Nach »Distillerie Française«, Wochenschrift f. Brauerei 1891, 545; vgl. auch Z. f. ges. Brauw. 1892, 123.

länger dauernden Einwirkung einer Temperatur von 55° das Enzym bereits abgetötet wird, ergab schon der erste Versuch, dessen Resultate in folgender Tabelle I zusammengestellt sind:

Tabelle 1.

Ver- such:	Angewandte Substanz	Saccha- rometer- grade Balling	Polari- sation (α) ^{20°} _D	Reduci- render Zucker, als Mal- tose be- rechnet g	Dextro- azon aus 20 ccm Substanz g	Dextrose pro 100 ccm Substanz g
1.	100 ccm Maltoselösung + 1 g Hefepulver 1 ^h bei 55° digerirt, filtrirt:	6.4	117.2	6.048	0.126 0.123	0.599
2.	100 ccm Maltoselösung + 1 g Hefepulver 2 ^h bei 55° digerirt, filtrirt:	6.4	116.6	5.868	0.132 0.133	0.637
3.	100 ccm Maltoselösung + 1 g Hefepulver 24 ^h bei 55° digerirt, filtrirt:	6.4	116.7	5.688	0.125 0.122	0.594
4.	100 ccm Maltoselösung wurden auf 55° erwärmt, mit 1 g Hefepulver ver- rieben, sofort filtrirt:	6.1	119.7	6.260	0.212 0.210	1.014
5.	100 ccm Maltoselösung ohne Hefezusatz:	—	138.8	5.292	—	—
6.	100 ccm Wasser + 1 g Hefepulver 24 ^h bei 55° digerirt:	—	—	0	0	0

Es wurde, wie die Tabelle zeigt (Vers. 5), eine ca. 5procentige Maltoselösung und bei 40° getrocknete, gut gewaschene und fein zerriebene Unterhefe verwendet. Je 150 ccm der Maltoselösung wurden auf 55° erwärmt, mit 1 g Hefepulver verrieben und je 1, 2 und 24 Stunden mit der Hefe bei 55° digerirt. Um zu sehen, wie rasch die Einwirkung des Enzyms erfolgte, wurde eine 4. Portion derselben Maltoselösung (150 ccm) ebenfalls auf 55° erwärmt, dann mit 1 g Hefe verrieben und sofort filtrirt. Das Filtriren dauerte ca. 20 Minuten. Nach beendetem Versuch wurden sofort die Osazonproben auf Dextrose ausgeführt. Zu jedem Versuch wurden 20 ccm des klaren Filtrates verwendet, die mit 1 g Phenylhydrazin und 1 $\frac{1}{2}$ g 50procentiger Essigsäure 2 Stunden im Wasserbad auf 100° erhitzt wurden. Die Osazone wurden heiss auf ein vorher gewogenes Filter gebracht, mit siedendem Wasser (80 ccm) ausgewaschen und bei 110° getrocknet. Dabei zeigte sich nun das überraschende Resultat, dass in Versuch IV, in welchem nach dem Verrühren des Hefepulvers in der auf 55° erwärmten Maltoselösung diese sofort filtrirt und zu Osazonversuchen verwendet war, fast doppelt so viel Glycose gebildet war,

nämlich 1,014 g pro 100 ccm, als in den drei übrigen Versuchen, welche 1, 2 bzw. 24 Stunden mit der Hefe bei 55° digerirt und dann filtrirt waren. Letztere lieferten 0.599, 0.637 bzw. 0.594 g Dextrose pro 100 ccm. Damit übereinstimmend war auch die höhere Reduction in Versuch IV gegenüber den Versuchen I—III. Die Polarisation ergab zwar für Versuch IV einen etwas höheren Werth $[(\alpha)_D^{20} = 119.7^\circ]$ gegenüber den Werthen der drei übrigen Versuche $(\alpha)_D^{20} = 117.2^\circ, 116.6^\circ$ und 116.7° —, was indess darauf zurückzuführen ist, dass bei dem längeren Digeriren mit der Hefe aus dieser mehr Substanzen extrahirt wurden, welche das spezifische Gewicht der Lösungen erhöhten, also die spezifische Drehung verringerten.

Um nun die Optimaltemperatur für die Wirkung des in Frage kommenden Enzyms aufzufinden, wurden Versuche bei Temperaturen von 10, 20, 30, 40 und 50° ausgeführt. Auch wurden die Versuche insofern modificirt, als diesmal nicht mit Hefepulver direct digerirt, sondern mit Hefeauszug gearbeitet wurde. Letzterer wurde durch 15stündiges Digeriren von $7\frac{1}{2}$ g Hefe mit 150 ccm Wasser bei Zimmertemperatur erhalten. Von diesem Hefeauszug wurden je 20 ccm zu 150 ccm einer ca. 5procentigen Maltoselösung gegeben. Hefeauszug und Maltoselösung wurden vorher getrennt auf die gewünschten Temperaturen angewärmt. Die Versuchsdauer betrug jedesmal 2 Stunden.

Die Resultate sind in nachstehender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 2.

Angewandte Substanz	Temperatur	Versuchsdauer Std.	Saccharometer grade Balling	Polarisation $(\alpha)_D^{20}$	Reducirender Zucker als Maltose berechnet pro 100 ccm Substanz g	Dextrosazone menge pro 20 ccm Substanz g	Entsprechend g Dextrose pro 100 ccm Substanz
150 ccm Maltoselösung + 20 ccm aqua	—	—	—	139.0	4.624	—	—
150 ccm Maltoselösung + 20 ccm Hefeauszug	10°	2	5.35	123.9	5.424	0.124 0.125	0.600
	20°	2	5.3	120.9	5.672	0.208 0.209	1.005
	30°	2	5.3	119.4	6.064	0.306 0.308	1.475
	40°	2	5.3	109.1	6.616	0.378 0.381	1.825
	50°	2	5.25	125.7	4.881	0.078 0.079	0.375

Aus den Resultaten geht deutlich hervor, dass das Optimum für die Wirkung des Enzyms auf Maltose bei Temperaturen unter 50° liegt, wahrscheinlich bei 40° , da bis zu dieser Temperatur die Dextrosebildung für je 10° Temperatursteigerung proportional zunimmt. Um indess die Grenzen näher zu bestimmen, wurde eine dritte Versuchsserie ausgeführt.

Angewandt wurde dieselbe Maltoselösung (150 ccm), wie in der vorigen Serie. Der Hefeauszug war durch 24 stündiges Digeriren von $7\frac{1}{2}$ g Hefepulver mit 150 ccm Wasser bereitet. Wiederum wurden je 20 ccm Hefeauszug zu jedem Versuch verwendet. Die Versuche wurden bei Temperaturen von 35° , 40° und 45° ausgeführt. Die Resultate sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3.

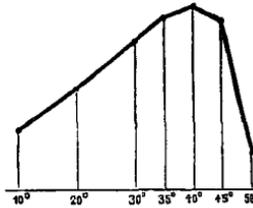
Angewandte Substanz	Temperatur	Versuchsdauer Std.	Saccharometergrade Balling	Polarisation (α) _D ^{20°}	Reducirender Zucker als Maltose berechnet pro 100 ccm Substanz g	Dextrosazon pro 20 ccm Substanz g	Daraus berechnete Dextrose in g pro 100 ccm Substanz
150 ccm Maltoselösung (v. Tab. 2.) und 20 ccm Hefeauszug	35°	2	5.65	96.1	7.508	0.606 0.607	2.916
	40°	2	5.65	94.9	7.580	0.640 0.641	3.079
	45°	2	5.65	96.4	7.060	0.587 0.590	2.829

Die Ergebnisse zeigen, dass das Optimum bei ca. 40° liegt. Bei 35° ist die Wirkung des Enzyms etwas schwächer als bei 40° ; bei 45° jedenfalls schon bedeutend schwächer als bei 35° .

Interessant ist auch die Beobachtung, dass in diesem Versuch bedeutend grössere Mengen Glycose gebildet wurden, als im vorigen Versuch, obwohl dieselbe Maltoselösung, dieselbe Zeitdauer und gleiche Mengen Hefeauszugs angewendet wurden. Die Ursache dafür liegt allein in der längeren Dauer des Extrahirens der Hefe (24 Stunden, vorigen Versuch 15 Stunden). Durch die längere Extractionsdauer war eine grössere Menge des Enzyms aus der Hefe diffundirt, eine Bestätigung der schon von Lintner¹⁾ ausgesprochenen Ansicht, dass das Enzym relativ schwer löslich sei.

Mit Hilfe der beiden letzten Versuchsserien lässt sich folgende Temperaturkurve für das Enzym aufstellen.

¹⁾ Zeitschrift für das gesammte Brauwesen 1894, XVII, 414.



Curve der Intensität der Einwirkung des Ferments auf Maltose bei Temperaturen von 10—50°.

Diese Curve zeigt, dass die Hydrolyse der Maltose bei gleichen Enzym-Mengen und gleicher Dauer bis zu Temperaturen von 35° direct proportional der Temperatur vor sich geht.

Um den Einfluss der Menge des Enzyms auf die Hydrolyse der Maltose festzustellen, wurden 4 Versuche ausgeführt.

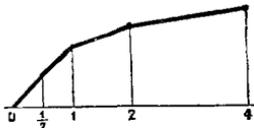
Angewandt wurden je 100 cem Maltoselösung mit 5.532 g Maltose. Die Dauer des Versuchs betrug 2 Stunden bei einer Temperatur von 40°. Es wurden je $\frac{1}{2}$, 1, 2 und 4 g Hefepulver zugesetzt.

Das Ergebniss zeigt folgende

Tabelle 4.

Hefezusatz pro 100 cem Maltoselösung g	Saccharometer- grade Balling:	Polarisation (α) _D ^{20°}	Dextrosazon pro 20 cem Filtrat g	Daraus berech- nete Dextrose pro 100 cem Filtrat g
$\frac{1}{2}$	6.3	115.4	0.346 0.342	1.654
1	6.6	90.0	0.634 0.634	3.048
2	6.9	80.0	0.821 0.818	3.940
4	7.4	67.4	0.995 —	4.784

Aus den Analysen ergab sich, dass die Hydrolyse der Maltose nicht proportional der einwirkenden Enzymmenge verläuft, dass vielmehr mit zunehmender Menge des Ferments eine relative Verzögerung der Wirkung eintritt, wie nachstehende Curve zeigt, deren Abscissen-Einheiten den angewandten Hefemengen und deren Ordinaten den erhaltenen Dextrosazon-Mengen entsprechen.



Um einen Versuch über eine längere Zeit ausdehnen zu können und gleichzeitig eine etwaige Bakterienwirkung auszuschliessen, wurde eine 2 procentige Maltoselösung einige Stunden mit Chloroform digerirt (10 g auf 2 L Maltoselösung).

Verwendet wurden je 100 ccm Maltoselösung und 10 ccm eines Hefeauszugs, der durch 12 stündiges Digeriren von 20 g bei 40° getrockneter Hefe mit 200 ccm Wasser erhalten war.

Als Parallelversuch wurden für die ersten zwei Stunden je 100 ccm derselben Maltoselösung ohne Chloroformzusatz mit je 10 ccm desselben Hefeauszugs versetzt. Die Versuche wurden sämtlich bei einer Temperatur von 40° ausgeführt.

Ein letzter Versuch endlich wurde folgendermaassen angeordnet: Zu je 100 ccm der mit Chloroform versetzten Maltoselösung wurden 10 ccm Hefeauszug gegeben; nach 2, 4, 6 Stunden wurden dann noch je weitere 10 ccm desselben Hefeauszugs hinzugefügt. Wie die nachstehende Tabelle 5 zeigt, wurden zwar in diesem Versuch (9) grössere Mengen Dextrosazon nach 24 stündiger Einwirkung gefunden als in Versuch 8, der nur einen einmaligen Zusatz von 10 ccm Hefeauszug erhalten hatte bei gleicher Versuchsdauer, indess war auch hier (in Versuch 9) noch nicht alle Maltose invertirt worden, denn es wurden nur 1.509 g Dextrose erhalten (auf die ursprüngliche Concentration berechnet), während theoretisch 2.105 g Dextrose gebildet werden müssten (0.104 g Dextrosazon für 0.1 g Dextrose gerechnet). Es waren mithin nach 24 Stunden nur ca. 71 pCt. der Maltose invertirt worden.

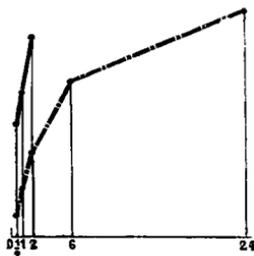
Tabelle 5.

Versuch	Angewandte Substanz		Dauer des Versuchs	Dextrosazon pro 200 ccm Substanz	Daraus berechnete Mengen Dextrose pro 100 ccm Substanz
			Std.	g	g
1	ohne Chloroformzusatz	100 ccm Maltoselösung + 10 ccm Hefeauszug	1/3	0.120	0.577
2				0.120	
3			1/2	0.155	0.752
4				0.158	
5	mit Chloroformzusatz	100 ccm Maltoselösung + 40 ccm Hefeauszug	1	0.215	1.038
6				0.217	
7			1/3	0.021	0.108
8				0.024	
9			2	0.052	0.245
10	0.050				
11	6	0.090	0.442		
12		0.094			
13	24	0.166	0.798		
14		0.166			
15	24	0.240	1.159		
16		0.242			
17	24	0.247	1.509 ¹⁾		
18		0.246			

¹⁾ Auf die ursprüngliche Concentration berechnet.

Aus dieser Tabelle ergibt sich deutlich der hemmende Einfluss des Chloroformzusatzes. Denn während in den Versuchen 1, 2 und 3 ohne Chloroformzusatz nach $\frac{1}{2}$, 1 bzw. 2^h bereits 0.577; 0.752 bzw. 1.038 g Dextrose gebildet waren, lieferten Versuch 4, 5 und 6 mit Chloroformzusatz in der gleichen Zeit aus 0.108; 0.245 bzw. 0.442 g Dextrose.

In nachfolgender Zeitcurve sind diese Versuche so zusammengestellt, dass die Abscissen der Zeitdauer, die Ordinaten den gebildeten Dextrosemengen entsprechen.



— ohne Chloroformzusatz.
 - - - mit Chloroformzusatz.

Zum Schluss wurde noch die Einwirkung des Hefe-Enzyms auf Dextrin geprüft. 5 g Achroodextrin wurden in 90 ccm Wasser gelöst und mit 10 ccm Hefeauszug (entsprechend 1 g getrockneter Hefe) 2 Stdn. im Wasserbad auf 40° erwärmt. Die darauf vorgenommene Osazonprobe ergab, dass keine Dextrose gebildet worden war.

Gährungschemisches Labor. der kgl. techn. Hochschule München.

216. W. v. Miller und Rhode: Zur Constitution des Cinchonins.

[3. Mittheilung aus dem Laboratorium der techn. Hochschule zu München.]
 (Eingegangen am 26. April.)

Die Schwierigkeit, den von Skraup und Konek de Norwall¹⁾ bewiesenen tertiären Charakter des Stickstoffs in der sogen. 2. Hälfte der Chinaalkaloide mit der secundären Natur des Cincholeupons und der Cincholeuponsäure in Einklang zu bringen, ist, wie wir glauben, durch die in unseren beiden vorigen Abhandlungen²⁾ im Cinchonin angenommene und experimentell gestützte Kohlenstoff-Stickstoffbindung beseitigt worden. Diese Bindung, die im Cincholeupon und in der

¹⁾ Skraup u. Konek de Norwall, diese Berichte 26, 1968.

²⁾ W. v. Miller u. Rhode, diese Berichte 27, 1187 u. 1279.