

scheidet, welches kein Halogen mehr enthält. Der Alkohol wurde jetzt grösstentheils weggedampft, der Rückstand mit Wasser versetzt und das abgeschiedene Oel ausgeäthert. Der beim Verdampfen des Aethers bleibende Rückstand erstarrt bald krystallinisch. Die Masse wurde zunächst mit sehr wenig Benzol angerieben und abgesaugt. Die Ausbeute an diesem Product betrug 25 pCt. des angewandten Bromdiphenacyls. Die Substanz wurde jetzt in wenig warmem Benzol gelöst; beim Abkühlen schied sie sich in fast farblosen, meist büschelförmig vereinten Nadeln ab, welche mit Petroläther gewaschen wurden. Zur völligen Reinigung wurden sie nochmals in viel heissem Wasser gelöst und durch wenig Thierkohle entfärbt. Beim Erkalten krystallisirten völlig farblose Nadeln, welche bei 93 bis 94° schmolzen und für die Analyse im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet wurden.

Analyse: Ber. für $C_{16}H_{18}O_2$.

Procente: C 79.34, H 7.44.

Gef. » » 79.05, » 7.66.

Die Verbindung ist in Alkohol, Benzol und Aether leicht löslich, über den Schmelzpunkt erhitzt sublimirt sie. Dass sie die oben angenommene Constitution besitzt, beweist auch ihre directe Entstehung aus dem Diphenacyl. Die Reduction des letzteren wurde ebenfalls in 70procentiger alkoholischer Lösung mit Natriumamalgam ausgeführt, und das erhaltene Product zeigte genau die oben angegebenen Eigenschaften.

585. Emil Fischer und Paul Lindner: Ueber die Enzyme einiger Hefen.

(Eingegangen am 28. November.)

Die Annahme, dass der Vergäherung der Polysaccharide durch Hefen die Hydrolyse vorausgehe, ist jetzt durch so zahlreiche Beobachtungen bestätigt worden, dass man jede anderslautende Angabe der Literatur mit Misstrauen betrachten muss.

Nichtsdestoweniger halten wir die fortwährend erneute Prüfung derselben für sehr wünschenswerth, und von diesem Gesichtspunkte aus haben wir die nachfolgenden Versuche angestellt.

Verhalten der Melibiose gegen Bierhefen¹⁾.

Das von Scheibler und Mittelmeier näher untersuchte Disaccharid wird bekanntlich von den in der Bierbrauerei gebräuchlichen

¹⁾ Dieser Theil der Untersuchung ist von uns bereits in der *Wochenschrift für Brauerei* vom 4. October d. J. veröffentlicht worden.

Unterhefen vergohren, dagegen von manchen Oberhefen nicht angegriffen. Dementsprechend haben wir gefunden, dass die Unterhefen vom Typus Froberg und Saaz ein Enzym enthalten, welches die Melibiose spaltet. Dasselbe lässt sich aus den getrockneten Hefen mit Wasser auslaugen. Für die Versuche dienten zwei Reinculturen, welche auf Bierwürze im Pasteur'schen Kolben gezogen und durch sehr sorgfältiges Waschen mit Wasser von der Nährflüssigkeit vollständig getrennt waren.

Die Hefen wurden dann auf porösem Thon ausgebreitet, drei Tage an der Luft bei 20—25° getrocknet, zerrieben, mit der zwanzigfachen Menge Wasser 20 Stunden bei 33° ausgelaugt, und die Lösung durch wiederholte Filtration möglichst vollständig geklärt.

Für den Nachweis der Hexosen (Glucose und Galactose), welche durch Spaltung der Melibiose entstehen, diente wieder die Phenylhydrazinprobe. Da das Melibiosazon in heissem Wasser ziemlich leicht löslich ist, so giebt dieselbe hier ebenso entscheidende Resultate wie bei der Maltose und dem Milchzucker.

Die Melibiose war nach den Angaben von Scheibler und Mittelmeier dargestellt und derart gereinigt, dass sie weder Raffinose noch Hexosen in nachweisbarer Menge enthielt. Um jede Gärung zu verhindern, wurde dem Auszug noch Toluol hinzugefügt.

1. Versuch: 0.3 g Melibiose wurden mit 3 ccm Auszug von Froberg-Unterhefe 20 Stunden bei 35° behandelt, dann filtrirt, zur Fällung von Proteinstoffen unter Zusatz von 0.25 g Natriumacetat 10 Minuten im Wasserbade erwärmt, wieder filtrirt, auf 6 ccm verdünnt und mit 0.6 g reinem Phenylhydrazin und 0.6 g 50procentiger Essigsäure 1½ Stunden auf dem Wasserbade erhitzt. Die Menge des sorgfältig gereinigten Phenylhexosazons betrug 0.05 g.

2. Versuch: 0.3 g Melibiose mit Auszug von Saaz-Unterhefe behandelt gab 0.04 g Phenylhexosazon.

An Stelle des Enzym-Auszuges wurden dann die getrockneten Hefen selber verwendet.

3. Versuch: Angewandt 0.5 g Melibiose, 5 ccm Wasser, 0.5 g trockne Froberg-Unterhefe und zur Verhinderung der Gärung 0.05 g Toluol. Dauer der Einwirkung: 20 Stunden bei 35°. Erhalten: 0.33 Hexosazon.

4. Versuch: 0.25 g Melibiose, 2.5 ccm Wasser, 0.12 g trockne Saaz-Unterhefe, 0.025 g Toluol. 20 Stunden bei 35°. Erhalten: 0.031 Hexosazon.

Bei Anwendung von Thymol an Stelle von Toluol waren bei Froberghefe, welche allein geprüft wurde, die Resultate qualitativ die gleichen. Wie leicht erklärlich, ist also die Wirkung der Hefen etwas stärker als diejenige der Auszüge.

Ebenso wirksam zeigten sich die nicht getrockneten Hefen, wie die beiden folgenden Versuche beweisen. Dabei kamen wieder frisch bereitete Reinculturen zur Anwendung. Dieselben wurden durch ein Pukall'sches Ballonfilter von der Nährlösung getrennt, dann nochmals mit reinem Wasser angeschlemmt, wieder scharf abgesaugt und sofort in die Zuckerlösung übertragen. Da diese Operation nur eine Stunde dauerte, und dabei das Austrocknen vermieden war, so können die Hefen als ganz frisch gelten.

5. Versuch: 0.2 g Melibiose, 0.25 g frische Froberg-Unterhefe, 2 ccm Wasser und 0.025 g Toluol. Dauer der Einwirkung 38 Stunden bei 33°. Erhalten: 0.135 g Hexosazon.

6. Versuch: 0.2 g Melibiose, 0.25 g feuchte Saaz-Unterhefe, 2 ccm Wasser und 0.025 g Toluol. 38 Stunden bei 33°. Erhalten: 0.0627 g Hexosazon.

Damit ist der Einwand, dass das spaltende Enzym erst beim Trocknen der Hefe entstehen könne, widerlegt.

Ganz anders waren die Resultate bei den Oberhefen Froberg und Saaz, welche ebenfalls als Reinculturen zur Anwendung kamen. Bei vier weiteren Versuchen, welche genau in derselben Weise wie die Nummern 1—4 ausgeführt waren, konnte durch Phenylhydrazin keine Spaltung der Melibiose nachgewiesen werden.

Wir schliessen daraus, dass die getrockneten Oberhefen kein Enzym enthalten, welches eine nennenswerthe Spaltung des Disaccharids bewirken kann. Da aber noch die Möglichkeit vorlag, dass die frischen Hefen sich anders verhalten würden, so haben wir auch diese geprüft.

11. Versuch: 0.5 g Melibiose, 5 ccm Wasser, 0.25 g ganz frische Froberg-Oberhefe (Reincultur), 0.05 g Toluol. 20 Stunden bei 35°. Kein Hexosazon gebildet.

12. Versuch: Genau ebenso wie Versuch 11, mit frischer Saaz-Oberhefe (Reincultur) ausgeführt. Ebenfalls kein Hexosazon erhalten.

Da die Oberhefen Saaz und Froberg das den Rohrzucker spaltende Invertin enthalten, so stand unser Resultat in Widerspruch mit der Angabe von Scheibler und Mittelmeier¹⁾, dass die Melibiose durch längere Behandlung mit Invertin völlig gespalten werde. Wir haben deshalb diesen Versuch wiederholt und bei Anwendung von gut wirkendem Invertin, welches zudem in ungewöhnlich grosser Menge angewandt wurde, keine Veränderung des Disaccharids beobachten können.

13. Versuch: 0.3 g Melibiose, 1.5 g Wasser, 0.3 g Invertin 22 Stunden bei 35° C. behandelt. Kein Hexosazon gebildet.

¹⁾ Diese Berichte 22, 3121.

Wir glauben deshalb, dass das Invertin, welches die HH. Scheibler und Mittelmeier benutzten, noch die anderen Enzyme der Bierhefe enthielt.

Verhalten der *Monilia candida* gegen Rohrzucker und Maltose.

Ch. E. Hansen hat beobachtet, dass die Hefe den Rohrzucker vergährt, aber kein Invertin ausscheidet. Hier schien also eine Ausnahme von der bisher bestätigten Regel vorzuliegen, und wir haben deshalb diesen Fall mit besonderer Aufmerksamkeit geprüft. Zunächst können wir die Angabe von Hansen vollauf bestätigen; weder aus der frischen, noch aus der getrockneten *Monilia* lässt sich ein Enzym extrahieren, welches den Rohrzucker hydrolysiert. Die Hefe, welche ebenfalls im Pasteur'schen Kolben in Bierwürze gezüchtet war, wurde wiederum mit einem Pukall'schen Ballonfilter abgesaugt, was hier mehrere Stunden in Anspruch nahm. Da die Nährflüssigkeit noch reducirende Kohlehydrate enthielt, so musste die Hefe mehrmals mit reinem Wasser angeschlemmt und wieder abgesaugt werden, bis weder sie selbst, noch das Filtrat Kupferlösung reducirte. Diese frische Hefe übte bei Gegenwart von anästhesirenden Mitteln auf Rohrzucker keine deutliche Wirkung aus.

14. Versuch: 0.6 g frische *Monilia*, 0.6 g Rohrzucker, 6 ccm Wasser und 0.05 g Toluol wurden 38 Stunden auf 33° erwärmt. Die filtrirte Lösung reducirte Fehling'sche Flüssigkeit so schwach, dass nur einige Procent Invertzucker vorhanden sein konnten. Da eine Controlprobe mit derselben Flüssigkeit ohne Hefe fast gleiche Reaction zeigte, so war keine deutlich wahrnehmbare Hydrolyse des Rohrzuckers durch die Hefe eingetreten.

15. Versuch: Ebenso ausgeführt wie der vorhergehende, nur an Stelle des Toluols 0.012 g Thymol angewandt. Das Resultat war das nämliche.

Die gleiche Hefe wurde jetzt auf porösem Thon ausgebreitet, 3 Tage lang bei etwa 15° an der Luft getrocknet und fein zerrieben. Aus diesem Präparat wurde durch 40stündiges Auslaugen mit der 20fachen Menge Wasser bei 33° und nachfolgende wiederholte sorgfältige Filtration durch Papier ein Auszug bereitet.

16. Versuch: 5 ccm des Auszugs und 0.5 g Rohrzucker wurden 44 Stunden auf 33° erwärmt. Resultat ebenso negativ wie vorher. Das Gleiche war der Fall, als derselbe Versuch unter Zusatz von 0.05 g Toluol wiederholt wurde.

Wesentlich anders gestaltet sich die Erscheinung, wenn man die getrocknete Hefe selbst bei Gegenwart von anästhesirenden Mitteln auf den Zucker einwirken lässt, denn es tritt dann eine starke Hydrolyse desselben ein.

17. Versuch: 0.5 g Rohrzucker, 0.2 g getrocknete Monilia, 5 ccm Wasser und 0.05 g Toluol wurden im geschlossenen Rohr 40 Stunden auf 33° erwärmt. Die Titration mit Fehling'scher Lösung ergab, dass 40 pCt. Invertzucker entstanden waren.

18. Versuch: 0.5 g Rohrzucker, 0.25 g trockne Monilia (andere Kultur), 5 ccm Wasser und 0.05 g Toluol 40 Stunden auf 35° erwärmt. Es waren 50 pCt. des Zuckers gespalten. Ein weiterer Versuch ebenso angestellt, ergab sogar 60 pCt. Invertzucker.

Aus diesen Resultaten scheint uns klar hervorzugehen, dass in der getrockneten Monilia ein in Wasser unlöslicher Stoff vorhanden ist, welcher den Rohrzucker spaltet. Derselbe ist aber leicht zerstörbar, denn er wird schon durch längere Berührung mit Toluol unwirksam.

19. Versuch: 0.2 g getrocknete Monilia wurden mit 5 ccm Wasser und 0.05 g Toluol 24 Stunden auf 33° erwärmt, dann der Lösung 0.5 g Rohrzucker zugefügt und noch weitere 33 Stunden auf derselben Temperatur gehalten. Die filtrirte Flüssigkeit übte jetzt auf Fehling'sche Lösung nur eine äusserst schwache Wirkung aus. Das den Rohrzucker spaltende Agens war also durch die vorherige Behandlung mit Toluol zerstört.

Da nach obigen Erfahrungen die Vermuthung nahe lag, dass der den Rohrzucker spaltende Stoff erst beim Trocknen der Monilia entstehe, so haben wir schliesslich auch die ganz frische Hefe geprüft, nachdem durch sorgfältiges Verreiben mit Glaspulver ein Theil der Zellen geöffnet war.

20. Versuch: 0.8 g ganz frische, scharf abgesaugte Monilia wurden mit reinem Glaspulver sehr sorgfältig verrieben, dann mit 8 ccm Wasser, 0.8 g Rohrzucker und 0.08 g Toluol auf 33° erwärmt. Nach 16 Stunden waren 7 pCt. der Rohrzuckers gespalten und beim weiteren 24stündigen Erhitzen trat keine Vermehrung des Invertzuckers ein.

Die invertirende Wirkung der Hefe war also unter diesen Bedingungen zwar schwach, aber doch unverkennbar.

Aus allen diesen Beobachtungen glauben wir den Schluss ziehen zu dürfen, dass auch bei der Monilia Inversion des Rohrzuckers und alkoholische Gärung getrennte Prozesse sind, von welchen aller Wahrscheinlichkeit nach die erstere der primäre Vorgang ist. Das invertirende Agens scheint allerdings hier kein beständiges, in Wasser lösliches Enzym, sondern ein Bestandtheil des lebenden Protoplasmas zu sein. Jedenfalls kann das Beispiel der Monilia nicht mehr als Argument gegen den allgemeinen Satz, dass der alkoholischen Gärung der Polysaccharide die Hydrolyse vorausgehe, angesehen werden.

Viel einfacher sind die Erscheinungen bei der Maltose, denn dieselbe wird sowohl durch die frische, wie durch die getrocknete Monilia oder den wässrigen Auszug der letzteren gespalten.

21. Versuch: 0.4 g Maltose, 0.2 g frische *Monilia*, 4 ccm Wasser und 0.04 g Toluol 36 Stunden bei 35° gehalten. Gewonnen 0.07 g Glucosazon.

22. Versuch: Die getrocknete *Monilia* wurde mit Glaspulver zerrieben und mit der 10 fachen Menge Wasser 20 Stunden bei 35° ausgelangt. 0.4 g Maltose mit 4 ccm dieses Auszugs 30 Stunden bei 35° behandelt. Erhalten 0.08 g Glucosazon.

Die *Monilia* enthält also gerade wie *S. cerevisiae* eine in Wasser lösliche Maltase.

Verhalten von *Saccharomyces apiculatus* gegen Rohrzucker.

Die Hefe vergäht bekanntlich den Rohrzucker nicht; dementsprechend haben wir gefunden, dass dieselbe weder im frischen noch im getrockneten Zustand befähigt ist, bei Gegenwart von Toluol das Disaccharid zu spalten.

23. Versuch: 0.5 g feuchter, ganz frischer *S. apiculatus*, 5 ccm Wasser, 0.5 g Rohrzucker und 0.05 g Toluol wurden 40 Stunden auf 33° erwärmt. Bildung von Invertzucker kaum nachweisbar.

24. Versuch: 0.25 g reiner *S. apiculatus*, welcher auf porösem Thon einen Tag an der Luft bei Zimmertemperatur, dann zerkleinert und noch 24 Stunden bei 33° getrocknet war, wurde mit 0.5 g Rohrzucker, 5 ccm Wasser und 0.05 g Toluol 40 Stunden bei 33° behandelt. Invertzucker nicht nachweisbar.

Die Wirkung derselben Hefe auf Maltose werden wir später beschreiben.

Schliesslich sagen wir den Herren Dr. P. Rehlaender und Dr. P. Hunsalz für die Hülfe, welche sie bei dieser Arbeit geleistet haben, besten Dank.

586. Joh. Pinnow: Ueber Derivate des Dimethyl-*p*-toluidins.

[Aus dem II. chemischen Institut der Universität Berlin.]

(Eingegangen am 25. November.)

In einer früheren Mittheilung über Tetramethyldiamidodiphenylmethan¹⁾ kündigte ich an, dass einige der dort beschriebenen Versuche, soweit sie nicht den gewünschten Erfolg hatten, mit Derivaten des Dimethyl-*p*-toluidins wiederholt werden sollten, also die Einwirkung salpetriger Säure auf *o*-Nitrodimethyl-*p*-toluidin und Darstellung und Reduction des *m*-Nitrodimethyl-*p*-toluidins.

o-Nitrodimethyl-*p*-toluidin (7.5 g) (D. R.-P. 69188) wird in Salzsäure von 20 pCt. (122 g) gelöst und langsam unter guter Kühlung

¹⁾ Diese Berichte 27, 3161.