

ristisches Reinheitskriterium verwendeten Erstarrungspunkte bei den ersten Gliedern dieser homologen Reihe bei sehr tiefen Temperaturen liegen und nur schwer genau bestimmbar sind (glasige Erstarrung, große Unterkühlung), während die „Chlorexpunkte“ durch Abkühlung mit festem CO₂, größtenteils aber schon mit Eis-Kochsalz-Lösung erreicht werden können und die Entmischungspunkte sehr präzise innerhalb 0,1° feststellbar sind. Vom n-Amylalkohol an zeigen die „Chlorexpunkte“ deutlich eine Oszillation.

2. Die Unterschiede in den „Chlorexpunkten“ zwischen normaler und verzweigter Kette im Alkoholmolekül bis zur C-Zahl 6 (siehe Abb. 1) sind so groß, daß aus der Lage der „Chlorexpunkte“ auf eine mögliche Art von Isomerenbeimengung geschlossen werden kann.

3. Auf Grund des wesentlich verschiedenen Mischungsverhaltens ist mit Hilfe von *Chlorex* eine Trennung zwischen

a) gesättigten und ungesättigten aliphatischen Alkoholen, bzw.

b) gesättigten aliphatischen und fettaromatischen Alkoholen möglich.

4. Die „Chlorexpunkte“ der höheren Diole liegen offenbar um zirka 60 bis 65° über denen der entsprechenden Mono-Alkohole.

Konzentrierung der im sauren Bereich optimal wirksamen Phosphomonoesterase aus Oberhefe.

(Kurze Mitteilung.)

Von

O. Hoffmann-Ostenhof und Elisabeth Putz.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 28. April 1949. Vorgelegt in der Sitzung am 12. Mai 1949.)

Die im sauren Bereich (p_H 3,8 bis 4,2) optimal wirksame Phosphomonoesterase der Oberhefe wurde zuerst von *H. Albers* und *E. Albers*¹ nachgewiesen. Weitere Untersuchungen über dieses Enzym stammen von *Schäffner* und *Krumey*² sowie von *Kobayashi*.³ Über eine weitergehende Reinigung und Konzentrierung dieses typischen Desmoferments scheint bisher noch nichts gearbeitet worden zu sein; das aktivste in der Literatur verzeichnete Präparat¹ zeigt eine Aktivität von 0,75 Phosphataseeinheiten PE nach *Albers* pro mg, wohingegen andere Phosphomonoesterasepräparate oft mehr als 100 PE/mg aufweisen.

¹ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **235**, 47 (1935).

² Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **255**, 145 (1938).

³ J. Biochem. **24**, 369 (1936).

Es ist uns nun gelungen, mit einer Methode, welche eine Variation derjenigen von *Schäffner* und *Krumey*² darstellt, eine Reinigung und Konzentrierung des Ferments zu erreichen. Wir geben hier eine kurze Übersicht über die angewandte Methodik:

Frische Oberhefe (von der Ottakringer Brauerei bezogen) wird zunächst mit fester Kohlensäure eingefroren und 3 Tage im Eisschrank aufbewahrt. Dann wird das noch hart gefrorene Material möglichst fein verteilt auf Filtrierpapier einer langsamen Trocknung unterworfen. Mit Hilfe dieser Verbindung von Kryolyse und Autolyse ist es möglich, das äußerst fest an die Zellbestandteile gebundene Ferment in die Lyoform zu überführen. Das erhaltene Trockenpräparat wird nun 2 Stunden lang bei 35° mit der fünffachen Menge Wasser extrahiert, der Extrakt zentrifugiert und die überstehende Lösung 3 bis 4 Stunden gegen Wasser dialysiert. Anschließend werden inaktive Begleitstoffe durch Zugabe von 0,5-normaler Essigsäure ausgefällt. Der so erhaltene Rohsaft zeigt 5 PE/ccm bei einem Trockengewicht von etwa 50 mg, also 0,1 PE/mg. Durch Einfrieren des Extrakts im Eisschrank koagulieren weitere Begleitstoffe; der flockige Niederschlag und das letzte Fünftel des auftauenden Rohsaftes wird verworfen. Die Aktivität des so behandelten Extraktes beträgt 0,2 PE/mg.

Der Extrakt wird nun in der Kälte (höchstens 5°) auf 50- bis 55%ige Methanolkonzentration gebracht, der entstandene Niederschlag schnellstens abzentrifugiert, in destilliertem Wasser aufgenommen und nach gutem Durchrühren und Stehenlassen über Nacht durch ein Glasfrittenfilter *Schott G 4* filtriert. Die so erhaltene Lösung zeigt eine Aktivität von 100 PE/ccm bei einem Trockengewicht von 5 mg/ccm; die Aktivität pro mg ist also 20 PE.

Das auf diesem Wege erhaltene Fermentpräparat hat also eine etwa 25fach stärkere Wirksamkeit als die aktivste bisher in der Literatur beschriebene Zubereitung mit gleicher Wirkung. Es läßt sich ohne Verlust an Wirksamkeit über einen Monat im Eisschrank aufbewahren. Eine Überführung in ein Trockenpräparat ist bisher noch nicht gelungen.

Es soll hier noch erwähnt werden, daß das beschriebene Präparat gegenüber Hemmstoffen, wie z. B. den Chinonen, weitaus empfindlicher ist als weniger aktive Zubereitungen. So bewirkt Benzochinon in $4 \cdot 10^{-4}$ molarer Konzentration 42%ige Hemmung des hochaktiven Ferments gegenüber nur 15%iger Hemmung eines Präparats, wie wir es in unserer früheren Mitteilung⁴ beschrieben hatten. Die entsprechenden Werte für Toluchinon in gleicher Konzentration sind 45% gegenüber 18%; für 4-Methoxytoluchinon 24% gegenüber 11%.

Versuche zu einer noch weitergehenden Reinigung sind in Vorbereitung.

⁴ Mh. Chem. 79, 421 (1948).