

Ueber das proteolytische und ein eiweisscoagulirendes Enzym in keimender Gerste (Malz).

Von

cand. mag. **Fr. Weis**

Assistent am Carlsberg-Laboratorium, Kopenhagen.

(Der Redaction zugegangen am 20. September 1900.)

I. Das proteolytische Enzym (Peptase).

Im Anschluss an die von Windisch und Schellhorn¹⁾, Fernbach und Hubert²⁾, sowie Petit und Labourasse³⁾ in den letzten Monaten veröffentlichten Mittheilungen über den Nachweis des proteolytischen Enzyms in keimender Gerste und Malz beabsichtige ich einige der wichtigsten Resultate zu veröffentlichen, welche ich durch meine Beschäftigung mit diesem Gegenstande im Laufe der letzten zwei Jahre erlangt habe. Dass dieses Enzym existiren musste, war mir a priori so einleuchtend, dass ich mich zu einer Veröffentlichung meines Nachweises desselben nicht veranlasst gefunden habe; bevor ich eine vollständige Bearbeitung meiner überaus zahlreichen Versuche über dessen Eigenschaften und Wirkungsweise vorlegen konnte. Ohne im geringsten jedoch die Priorität der Herren Windisch und Schellhorn in dieser Frage angreifen zu wollen, sehe ich mich doch schon jetzt, ehe meine Arbeit völlig abgeschlossen ist, veranlasst, eine vorläufige Mittheilung von derselben zu machen, welche ihre Berechtigung darin finden wird, dass ich durch andere Methoden, als die von den oben genannten Herren angewandten, die Existenz des Enzyms nachgewiesen, sowie durch quantitative Bestimmungen dessen Wirkungen und Abhängig-

1) Wochenschrift für Brauerei 17. Jahrgang d. 156. 296, 137. 207 1900.

2) Comptes rendus de l'Académie des sciences 256 1900.

3) Comptes rendus de l'Académie des sciences 307. 68 1900.

keit von äusseren Factoren verfolgt habe. Ich bin auch der Meinung, dieses Thema von theilweise anderen Gesichtspunkten aus, als die genannten Herren, behandelt zu haben, namentlich mit Rücksicht auf die Fragen, welche Bedeutung für die Praxis (z. B. die Wirkung des Enzyms auf den Brauprocess) erlangen können.

Der kürzlich verstorbene Professor Kjeldahl hat in Versuchen, die nicht veröffentlicht sind, die Existenz des Enzyms nachgewiesen, indem er Malzauszüge auf Gluten («Kleber») in schwachen salzsauren oder milchsauren Auflösungen einwirken liess und mit Hülfe von Kupfersulfat nach Neutralisation durch Natron-Seignettesalz die Menge des Eiweissstoffes, welcher von und nach den Versuchen ausfiel, bestimmte.

Da Prof. Kjeldahl aus anderen Gründen diese Versuche unterbrechen musste, habe ich dieselben auf seine Aufforderung wieder aufgenommen, bin jedoch bald zu einer anderen Arbeitsmethode übergegangen, welche sich für die Verfolgung des proteolytischen Processes bequemer zeigte. Kjeldahl's Versuche sind nämlich angestellt, bevor er seine Methode für die Bestimmung des Stickstoffes fand. Diese ist es, welche ich auf die unten angeführte Weise zur Anwendung gebracht habe.

Meine Versuche haben sich bisher in zwei Hauptgruppen getheilt: 1. Versuche mit Grünmalz, 2. Versuche mit Darrmalz, sowie ich gelegentlich auch die Enzymwirkungen im Auszug von Gerstenkörnern in späteren Keimungsstadien als dem Grünmalz untersucht habe.

1. Versuche mit Grünmalz.

Zu diesen sind die fertig gekeimten Gerstenkörner verwendet worden, unmittelbar bevor dieselben zum Trocknen auf die Darre gebracht werden. Die Körner wurden in einer Fleischhackemaschine zu einem dicken Brei zerquetscht und darauf mit Wasser angerührt (gewöhnlich 3 Theile Malz auf 4 Theile Wasser). Nach dem Verlaufe von $\frac{1}{2}$ —1 Stunde, während welcher Zeit die Masse einige Male umgerührt wurde, wurde sie auf ein Faltenfilter gegossen und das Filtrat auf

dasselbe zurückgegossen, bis es klar hindurch lief (in der Regel nach $\frac{1}{4}$ Stunde). Demnächst wurde das Ganze in einem Eisschranke bei einer Temperatur von circa 5° C. bis zum nächsten Tage gehalten, worauf das Filtrat zur Anwendung kam. Sollte derselbe Auszug in mehreren, aufeinander folgenden Tagen benutzt werden, so wurde er in einen Eiseimer mit einer Temperatur von 0° C. gebracht, wo derselbe sich ungeschwächt wenigstens 8 Tage lang halten könnte. Dahingegen wurde das Enzym nach und nach bei 5° C. stark geschwächt, wahrscheinlicher Weise in Folge einer bald eintretenden sauren Gährung des Auszugs. Zur Bestimmung der proteolytischen Wirkungen des Auszugs wurde an Stelle von Kleber ein aus Weizenmehl durch Behandlung mit 55° Alkohol ausgezogener Eiweissstoff (Weizenglutin) angewendet, der später durch wiederholtes Ausfrieren gereinigt und schliesslich mit absolutem Alkohol niedergeschlagen wurde, danach pulverisirt, mit Aether und Alkohol nachgewaschen, im Vacuum zu einem sehr feinen Pulver getrocknet, das in Wasser unlöslich, aber in sehr schwachen anorganischen Säuren, besser jedoch noch in Milch- oder Essigsäure, löslich ist. Bei den meisten meiner Versuche (Grundversuche) habe ich eine 2° ige Auflösung von Glutin in $0,4^{\circ}$ iger Milchsäure angewandt, welche ich mit einem gleich grossen Volumen Malzauszug vermischte, wodurch ich demnach 1° ige Glutin und $0,2^{\circ}$ ige Milchsäure ausser den im Malzauszug enthaltenen Eiweissstoffen und Säuren zu meiner Arbeit erhielt. 10 ccm. Glutinauflösung + 10 ccm. Malzauszug werden in einem 100 ccm.-Messkolben gemischt und bei 47° — 48° (was sich bei besonders angestellten Versuchen als Temperaturoptimum erwies) im Wasserbade (Maischbecher) 2 Stunden lang gehalten. Nach schneller Abkühlung wurden jedem Kolben 10 ccm. einer 5° igen Gerbsäurelösung zugesetzt, mit Wasser zu 100 ccm. verdünnt und nach einer Weile filtrirt. Das Filtrat war völlig wasserklar und von diesem wurden 50 ccm. zu jeder Bestimmung verwendet. Nach Eindampfen unter Zusatz von einigen Tropfen concentrirter Schwefelsäure in langhalsigen Kochkolben (Stickstoffkolben) ungefähr bis zur Trockne wurde die Stickstoffbestimmung auf gewöhnliche Weise

nach Kjeldahl's Methode ausgeführt. Da die N-Bestimmungen immer im Filtrat vom Gerbsäureniederschlage der Mischungen von Glutin und Malzauszügen, bez. von Glutin oder Malzauszügen allein, sowohl vor wie nach der Einwirkung ausgeführt wurden (das ganze unbeeinflusste Glutin wurde übrigens von Gerbsäure niedergeschlagen), wurde demnach die im Laufe der Versuche bemerkbare Zunahme des Stickstoffes in dem Filtrat von dem Gerbsäureniederschlage als Maass für die Wirkungen des proteolytischen Enzyms (Peptase) benutzt.

Ich gehe hier nicht näher auf die qualitative Seite der Sache ein, weil meine Versuche in dieser Richtung noch nicht abgeschlossen sind, sondern mache nur darauf aufmerksam, dass unter der Einwirkung des Enzyms eine bedeutende Menge von Stoffen gebildet werden, die nicht durch Gerbsäure gefällt werden, was sicherlich eine ziemlich tief gehende Zersetzung der Eiweissstoffe bezeichnet. Vergleichende Versuche, welche ich über die Einwirkung des Pepsins sowohl auf Glutin als auf Casein in milchsaurer und salzsaurer Lösung von verschiedener Stärke anstellte, gaben nämlich das Resultat, dass durch Malzenzym mehr N, der nicht von Gerbsäure ausgefällt wird, als durch Pepsin gebildet wurde. Das schliesst natürlicher Weise nicht aus, dass das Pepsin auf früheren Stadien der Zersetzung bei Weitem kräftiger gewirkt und z. B. eine grössere Menge von Albumosen und verschiedenen Peptonen gebildet haben kann. Man muss sich überhaupt, wenn es sich um Zersetzungen der Eiweissstoffe durch Enzyme handelt, genau einprägen, welche Art von Eiweissstoffen gemeint ist und welche Fällungsmittel angewendet werden. Denn die Bildung der Produkte, welche mit verschiedenen Fällungsmitteln nachgewiesen wird, kann möglicher Weise verschiedene Abhängigkeit von äusseren Factoren aufweisen. Ein bestimmtes Fällungsmittel enthüllt nur eine bestimmte Phase der Enzymwirkung. Beispielsweise wird angeführt, dass Kjeldahl durch Ausfällung mit CuSO_4 das Temperaturoptimum zwischen $50,5^\circ$ und 55° liegend fand, während ich bei Fällung mit Gerbsäure dasselbe zwischen 47° und 48° fand. Vielleicht wird der grösste Theil der

Produkte, die sich nicht mit CuSO_4 ausfällen lassen, bei $50,5-55^\circ$ gebildet werden, während bei $47-48^\circ$ die meisten der Stoffe entstehen, welche nicht durch Gerbsäure ausgefällt werden.

Hier werde ich denn einige der wichtigsten meiner zahlreichen Versuche anführen.

Der Einfluss der Temperatur. Der Malzauszug (Mu) wurde aus 1 Theil Malz und 2 Theilen Wasser bereitet, war also etwas schwächer als in späteren Versuchen. Von Glutin (Gl) wurde eine 2%ige Auflösung in einer 0,4%igen Milchsäure angewandt. 20 ccm. Mu + 10 ccm. Gl unter Zusatz von Thymol stand 2 Stunden lang bei verschiedener Temperatur. Spätere Versuche bewiesen, dass Thymol die Enzymwirkung abschwächt, daher fand ich verhältnissmässig niedrige Zahlen. Folgende 4 Versuchsreihen wurden mit demselben Malzauszug, jedoch zu verschiedenen Zeiten, angestellt. Derselbe stand in der Zwischenzeit im Eiseimer bei 0° , schwächte sich jedoch allmählich ab, wahrscheinlich in Folge des zugesetzten Thymols. Von den beiden zusammengehörigen Kolonnen wird die rechte angeben, wie viele Milligramm N sich nach den Versuchen der Fällung durch Gerbsäure entzogen haben, der Abkürzung wegen peptonisirter N. genannt.

I. Reihe		II. Reihe		III. Reihe		IV. Reihe	
27. Januar 1899		27. Januar 1899		28. Januar 1899		30. Januar 1899	
Temp.	Peptonis. N	Temp.	Peptonis. N	Temp.	Peptonis. N	Temp.	Peptonis. N
5°	0,00 mg	—	—	—	—	—	—
15°	0,42 »	—	—	—	—	—	—
25°	1,42 »	—	—	—	—	—	—
35°	3,80 »	47°	5,42 mg	46°	4,50 mg	—	—
45°	5,34 »	49°	5,14 »	48°	4,58 »	—	—
50°	5,38 »	51°	4,88 »	52°	4,14 »	50°	3,92 mg
55°	3,54 »	53°	4,74 »	54°	3,26 »	—	—
60°	2,04 »	—	—	—	—	—	—
65°	—	—	—	—	—	65°	1,40 mg
70°	—	—	—	—	—	70°	0,08 »

In einer anderen Versuchsreihe, welche 4 Stunden dauerte, zeigte sich jedoch ein Steigen des peptonisirten N zwischen 0—5°.

0°	: 0,01 mg N
5°	: 0,30 mg N
10°	: 1,47 mg N
20°	: 2,32 mg N.

Zusammen genommen weisen die genannten Versuche ein allmähliches Steigen mit der Temperatur von 0° bis 47°—48° auf und danach ein jähes Fallen bis 70°, bei welcher Temperatur eine jede Wirkung aufgehört hat.

Der Einfluss verschiedener Antiseptica. Zum Unterschied von mehreren anderen Enzymen ist das hier besprochene (welches ich Peptase zu nennen pflege) sehr empfindlich gegen Antiseptica, wie folgende Versuche beweisen werden. Nach Verlauf von 2 Stunden waren bei einer Temperatur von 47° in 10 cem. Gl. + 10 cem. Malzauszug gebildet folgende Mengen peptonisirtes N:

Ohne Antiseptica . . .	9,96 mg	Mit 0,00 % Formol . . .	10,16 mg
Mit Thymol gesättigt . . .	6,72	» 0,125 » . . .	6,28
Chloroform gesättigt . . .	5,82	» 0,50 » . . .	4,96
1% Formol . . .	3,20	» 0,75 » . . .	4,16
1% Benzoesäure . . .	2,16	» 1,00 » . . .	3,82
1% Salicylsäure . . .	0,92	» 1,25 » . . .	3,12
		» 1,50 » . . .	2,54

Die angeführten Stoffe bewirken demnach eine sehr merkbare Schwächung der Enzymwirkungen selbst in sehr schwachen Concentrationen. Wenn Benzoe- und Salicylsäure anscheinend kräftigst in solcher Hinsicht wirken, ist es sicherlich dem Umstande zuzuschreiben, dass diese theilweise das Glutin und damit ebenfalls das Enzym ausfällen. Dass Antiseptica allmählich das Enzym selbst destruiren und nicht an und für sich dessen Wirkung hindern, können vielleicht folgende Versuche ergeben. Die Destruction ist hier als ein langsam fortschreitender und nicht als ein augenblicklicher Process anzusehen.

	Ohne Formol	Mit 1% Formol
Nach 1/2 Stunde bei 47° wurde peptonisirt	3.82 mg N	1.12 mg N
Nach 1 Stunde bei 47° wurde peptonisirt	—	2.14 mg N
Nach 2 Stunden bei 47° wurde peptonisirt	10.16 mg N	2.46 mg N

Aus diesen Versuchen sieht man, wie vorsichtig man mit dem Zusetzen von Antiseptics sein muss. Dieselben sind auch bei späteren Versuchen nur ausnahmsweise benutzt, während man den Auszug durch Kaltstellen aufbewahrt. Lange dauernde Versuche werden ebenfalls unsicher, weil sich allmählich Fäulnisbakterien entwickeln. Deshalb haben meine folgenden Versuche meistens auch nicht über zwei Stunden gedauert.

Einfluss der Säuren. Im Gegensatz zu den Herren Windisch und Schellhorn habe ich stets die besten Resultate bei Anwendung von saurer Reaction erreicht. Die Versuche, welche ich bisher mit neutraler und alkalischer Reaction (zur Alkalisierung wurde 1/10 Normalnatronlauge gebraucht) angestellt habe, sind alle negativ ausgefallen. Trotz des günstigen Einflusses, den die Säuren haben, sind doch nur äusserst schwache Concentrationen gestattet: namentlich gilt dieses von den untersuchten unorganischen Säuren. Unten angegebene Versuche sind wie gewöhnlich mit 10 cem. Glutin in der betreffenden Säure aufgelöst und 10 cem. Malzauszug, welcher seine ursprüngliche (saure) Reaction bewahrt hat, angestellt. Letztere kann etwas in den verschiedenen Auszügen variiren, weil sie 1.25—2 cem. 1/10 Normalnatronlauge zur Neutralisation von 10 cem. verlangt.

Ein Zusatz von freier Säure erhöht doch immer die Selbstpeptonisirung des Malzauszuges in verhältnissmässig hohem Grade. Nach Ad. Ott (Zeitschrift für das gesammte Brauwesen, XX. 1897, S. 633—636) wird im normalen Malz und Würze keine freie Säure gefunden. Die saure Reaction rührt hauptsächlich von sauren Phosphaten her. Erst durch eintretende Gährung bilden sich freie organische Säuren (Milch-, Essig- und Bernsteinsäure). Es wird nämlich immer im Malzauszug ein Theil Eiweissstoff, der von dem Enzym be-

einflusst wird, gefunden. In den gewöhnlichen Auszügen von 3 Theilen Malz zu 4 Theilen Wasser wird in 10 ccm. 16 bis 19 mg Totalstickstoff gefunden, wovon ca. die Hälfte (durchschnittlich 52—53^o ‰, welche Zahlen nur sehr wenig variiren, zwischen 50,3 und 55,5^o ‰) nicht von Gerbsäure niedergeschlagen wird. In Versuchen mit Malzauszügen allein mit 0,2^o ‰iger Milchsäure wird der peptonisirte N in der Regel um 2,0 bis 2,5 mg im Laufe von 2 Stunden bei 47^o C. erhöht. Von dem Einfluss der Milchsäure auf die Selbstpeptonisirung des Malzauszuges gaben folgende Versuche einen Begriff:

10 ccm. Mu. 2 Stunden bei 47^o C.

Milchsäure	Peptonisirter N
0,0 ‰	0,72 mg
0,25 ‰	0,90 „
1,0 ‰	1,90 „
5,0 ‰	2,80 „
10,0 ‰	1,66
20,0 ‰	0,70

Wir erhalten hier in der Hauptsache dieselben Curven wie in den Versuchen durch Mischungen von Glutin und Malzauszug.

Milchsäure	Peptonisirter N		Essigsäure	Peptonisirter N	
	I.	II.		I.	II.
0,25 ‰ = ¹ / ₃₆₀ Normals	1,98 mg	— mg	0,15 ‰ = ¹ / ₄₀₀ Normals	1,98 mg	—
0,50 ‰ = ¹ / ₁₈₀	5,04	—	0,2 ‰ = ¹ / ₃₀₀	3,02	—
1,0 ‰ = ¹ / ₉₀	8,40	6,62	0,3 ‰ = ¹ / ₂₀₀	3,62	—
1,5 ‰ = ¹ / ₆₀	—	6,74	0,45 ‰ = ¹ / ₁₃₃	4,80	—
2,0 ‰ = ¹ / ₄₅	8,88	7,12	0,6 ‰ = ¹ / ₁₀₀	6,38	—
2,5 ‰ = ¹ / ₃₆	—	6,46	0,9 ‰ = ¹ / _{66,6}	7,76	—
3,0 ‰ = ¹ / ₃₀	—	6,40	1,5 ‰ = ¹ / ₄₀	8,44	7,04
3,5 ‰ = ¹ / _{28,5}	—	5,84	3,0 ‰ = ¹ / ₂₀	9,80	7,68
4,0 ‰ = ¹ / _{22,5}	7,04	5,64	4,5 ‰ = ¹ / _{13,3}	—	7,52
6,0 ‰ = ¹ / ₁₅	4,20	—	6,0 ‰ = ¹ / ₁₀	9,18	7,20
8,0 ‰ = ¹ / ₁₁	3,86	—	9,0 ‰ = ¹ / _{6,6}	—	6,54
10,0 ‰ = ¹ / ₉	2,56	—	12,0 ‰ = ¹ / ₅	—	5,20
15,0 ‰ = ¹ / ₆	1,52	—	18,0 ‰ = ¹ / _{3,3}	—	3,62
20,0 ‰ = ¹ / _{4,5}	1,12	—	30,0 ‰ = ¹ / ₂	—	1,98

Ueber den Einfluss der Salicylsäure siehe unten angeführte Maischversuche.

Salzsäure	Peptonisirter X	Schwefelsäure	Peptonisirter X
0.018° ₀₀ = 1/2000 Normals.	0.92 mg	0.024° ₀₀ = 1/2000 Normals.	0.94 mg
0.045° ₀₀ = 1/500	1.08	0.060° ₀₀ = 1/500	1.38
0.090° ₀₀ = 1/400	1.84	0.120° ₀₀ = 1/400	2.10
0.180° ₀₀ = 1/200	5.24	0.240° ₀₀ = 1/200	4.42
0.360° ₀₀ = 1/100	8.66	0.360° ₀₀ = 1/100	5.48
0.720° ₀₀ = 1/50	2.96	0.490° ₀₀ = 1/100	7.14
1.800° ₀₀ = 1/20	0.52	0.650° ₀₀ = 1/70	5.10
		0.980° ₀₀ = 1/50	0.06

Die angeführten Versuche zeigen, dass sowohl die organischen wie die unorganischen Säuren in einer gewissen Concentration einen stark beschleunigenden Einfluss auf die Wirkungen des Enzyms haben, aber dass letzteres ausserordentlich empfindlich geringen Veränderungen im Säuregrad gegenüber ist, namentlich gegenüber den unorganischen Säuren. Man kann nicht hinauf bis zu 1°₀₀ Schwefelsäure gelangen, bevor das Enzym plötzlich zersetzt wird, während 1/2°₀₀ einen sehr günstigen Einfluss auf dasselbe hat. Milchsäure und Essigsäure haben dahingegen noch bei 20—30°₀₀ einen sichtlich günstigen Einfluss, und das Optimum für diese Säuren liegt bei 2—4°₀₀.

Die Natur und Concentration des Eiweissstoffes. Wahrscheinlicher Weise verhält das Enzym sich verschiedenen Eiweissstoffen gegenüber verschieden. Vielleicht wird eben Fibrin, das von einigen Forschern, die zu negativen Resultaten gelangten, benutzt wurde, nicht beeinflusst. Es liegt nahe, anzunehmen, dass das Enzym besonders wirksam gegenüber den Eiweissstoffen der Gerste ist (Gerstenglutin), welche Einwirkung zuvörderst zu untersuchen insofern am natürlichsten sein würde. In Folge der grossen Schwierigkeit, welche die Herstellung einer so grossen Menge Gerstenglutin, wie ich zu meinen zahlreichen Versuchen nöthig hatte, verursacht, habe ich, wie schon erwähnt, an Stelle dessen Weizenglutin gebraucht, welches viel leichter herzustellen ist. Dass das Enzym

auch auf die Eiweissstoffe der Gerste wirkt, wird ebenfalls aus den untenangeführten Maischversuchen hervorgehen. — Was thierische Eiweissstoffe betrifft, habe ich nur die Wirkung auf Casein untersucht, sowohl in salzsaurer als auch in milchsaurer Lösung. In beiden Fällen wurde das Casein stark beeinflusst. In dem Versuch mit 1^o Casein und 0.36^o Salzsäure wurden 7.10 mg N peptonisirt, in einem anderen mit 2^o Milchsäure 9.16 mg N, wahrscheinlicher Weise ist ausserdem ein grösserer Theil des Caseins zu Produkten (Albumosen, Propeptonen u. a. m.) umgebildet, welche wohl von Gerbsäure, aber nicht von einigen anderen Eiweissfällungsmitteln niedergeschlagen werden.

Es muss auch nicht vergessen werden, die Frage zu erörtern, wie weit das Peptonisiren überhaupt geführt werden kann, d. h. wie gross der Theil eines Eiweissstoffes ist, der umgebildet werden kann, ob vielleicht die ganze Menge nach dem Verlauf einer gewissen Zeit umgebildet ist. Will man untersuchen, in welcher Concentration ein bestimmter Eiweissstoff am besten umgebildet wird, muss man zugleich zwischen der absoluten Menge des peptonisirten N und der Grösse der Procentmenge des Totalstickstoffes unterscheiden. Es ist selbstverständlich, dass die Versuchszeit hier ein wichtiger Factor ist. Ich habe hierüber einige Versuche mit 2^o Milchsäure angestellt, die ich unten ohne weitere Discussion anführe.

I. Versuchszeit 2 Stunden			II. Versuchszeit 5 Stunden		
Concentration des Glutins	Peptonisirter N	% des Total-N	Concentration des Glutins	Peptonisirter N	% des Total-N
0.25%	1.88 mg	25.00%	0.25%	3.42 mg	45.60%
0.5%	3.52	23.47%	0.5%	6.56	43.73%
1.0%	6.54	21.80%	1.0%	10.92	36.40%
2.0%	9.84	16.40%	2.0%	15.12	25.20%
3.0%	12.61	14.01%	3.0%	18.34	20.38%
4.0%	11.51	9.59%	4.0%	19.28	16.07%
5.0%	12.32	8.21%	5.0%	19.92	12.28%

Es scheint, dass die absolute Menge peptonisirter N, sobald man über 3% hinaus gelangt, nicht länger merklich mit der Concentration von Glutin vermehrt wird, selbst wenn

die Versuche lange dauern (5 Stunden). Wie es sich mit den nächsten Umbildungsprodukten des Glutins (Albumosen u. s. w.) verhält, klären diese Versuche nicht auf.

Das Keimungsstadium. Ausser bei dem fertigen (9 Tage alten) Grünmalz habe ich auch die Enzymwirkung bei Gerste in einem späteren Keimungsstadium untersucht. Fertiges Grünmalz wurde 7 Tage hindurch an einem dunkeln Orte in einer Trommel angebracht, welche häufig herumgedreht und befeuchtet wurde. Aus den Körnern mit ihren langen Wurzeln und 7,8 cm. langen etiolirten Sprösslingen wurde durch Zerquetschen und Pressen ein wässriger Auszug mit ungefähr derselben Menge Totalstickstoff (19,42 mg in 10 ccm.) wie aus dem gewöhnlichen Malzauszug zubereitet. Von den 19,42 mg N wurden 11,76 mg oder 60,5% nicht durch Gerbsäure gefällt. (Vergl. S. 85.) Unter dem fortgesetzten Keimungsprocess sind also ferner circa 8% von dem Totalstickstoff peptonisirt worden. Wurde diesem Auszug 0,2% Milchsäure zugesetzt, so wurden in 2 Stunden bei 44°, ferner 2,30 mg N peptonisirt und liess ich das Malzenzym ein gleiches Volumen (10 ccm.) einer 2% igen Glutininlösung mit 0,4% Milchsäure beeinflussen, wurden 6,52 mg N des Glutins peptonisirt, also nur etwas weniger als in den Versuchen mit Grünmalzauszügen. Das eigentliche Selbstpeptonisierungsvermögen, wie das Vermögen, Weizenglutin umzubilden, hält sich demnach in späteren Keimungsstadien (bei 16 Tage alten Gerstenkeimpflanzen) beinahe ungeschwächt.

2. Versuche mit Darmmalz.

Es ist von besonderem Interesse für die Praxis, zu erfahren, ob das Enzym die verhältnissmässig hohe Temperatur (auf Alt Carlsberg Malzerei bis gegen 90°), wie man sie beim Trocknen des Malzes gewöhnlich gebraucht, ertragen kann.

Als Fortsetzung der vorangegangenen Versuche untersuchte ich darauf zunächst 1. ob der Darmmalzauszug auch auf Glutin wirke, und danach 2. ob eine Zersetzung der eigentlichen Malzeiweissstoffe unter dem Brauprocess, dem Maischen, vor sich geht.

Das angewandte Malz wurde auf einer Mühle ungefähr zu feinem Mehl gemahlen, in welchem dieⁿ Spreustückchen gleichmässig sich vertheilen liessen. Die Masse wurde nun mit verschiedenen Mengen Wassers, bezw. 4 und 2 Theilen auf 1 Theil Malz digerirt. Im ersten Falle setzte ich 0,2% ige Milchsäure dem Wasser zu und liess den Auszug auf eine Glutininlösung in derselben Concentration von Milchsäure wirken: wo die rein wässerigen Auszüge angewandt wurden, wirkten sie dahingegen auf eine Glutininlösung in 0,4% iger Milchsäure und zur Untersuchung der Selbstpeptonisirung der Auszüge wurden sie mit einem gleichen Volumen Wassers mit oder ohne 0,2% ige Milchsäure verdünnt, so dass der schliessliche Gehalt an Milchsäure 0,2% oder 0% war. Ferner wurden vergleichende Versuche mit dem milchsauren Auszug angestellt, wobei derselbe in dem einen Fall in einem Wasserbade bei 100° erwärmt und bei dieser Temperatur 10 Minuten lang erhalten wurde, um das Enzym zu zerstören. Dabei wurden wie gewöhnlich 10 ccm. Malzauszug und 10 ccm. Glutin in 2% iger Auflösung verwendet.

Die Resultate der Versuche waren folgende:

	Total-N		Peptonisirter N			
	Nach zweistündiger Digestion bei 5°		Nach weiteren zwei Stunden bei 47°			
			Ohne Glutin	Differenz	Mit Glutin	Differenz
Wässriger Auszug	10,72 mg	5,90 mg	5,94 mg	0,04 mg	9,00 mg	3,10 mg
Milchsaurer ..	11,20 "	6,82 "	7,72 "	0,90 "	11,62 "	4,80 "
	Nach einständiger Digestion bei 48°					
Milchsaurer Auszug						
a. Nicht gekocht	10,29 mg	5,74 mg	6,54 "	0,80 "	9,90 "	4,16 "
b. Gekocht	10,16 "	5,64 "	5,70 "	0,06 "	5,62 "	0,08 "
Wässriger Auszug von 1 Theil Malz und 2 Theilen Wasser	21,60 mg	10,74 mg			22,64 mg	11,90 mg

Diese Versuche beweisen also: 1. eine deutliche Enzymwirkung ebenfalls im Darrmalzauszug, indem dabei sowohl eine Selbstpeptonisierung wie auch eine Umbildung des Weizenglutins eintritt; 2. dass ein geringer Gehalt an Milchsäure einen stark beschleunigenden Einfluss hat; 3. dass Kochen das Enzym zerstört und 4. dass eine gewisse Proportionalität zwischen den Enzymwirkungen und der Menge des im Auszug sich findenden Stickstoffes existiert (vgl. Stickstoffgehalt und Enzymwirkungen im Grünmalzauszug).

Demnach musste man annehmen, dass das Enzym ebenfalls unter dem Brauprocess sowohl auf gelöste wie ungelöste Eiweissstoffe wirkte, und es war deshalb von grösstem Interesse, diese Wirkungen so weit wie möglich unter denselben Versuchsbedingungen zu verfolgen, wie sie in der Brauerei vorgefunden werden, jedoch mit den Modificationen, welche die Laboratoriumversuche bedingen, und mit solchen Parallelversuchen, die zu einem ferneren Verständnisse des Processes führen könnten. Ich stellte deshalb u. A. folgende Maischversuche an: Zu jedem dieser Versuche wurden 50 g fein gemahlenes Malz verwendet, welchem 200 ccm. im Voraus zur betreffenden Temperatur erwärmtes Wasser zugesetzt wurden. Die Mischung wurde in einem Maischbecher ins Wasserbad gebracht und ca. alle 10 Minuten umgerührt. Je nachdem das Wasser verdampfte, wurde es wieder aufgefüllt.

Nach dem Maischen wurde der Inhalt in 250 ccm. Messkolben gegossen, es wurde bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und mit Chloroform gesättigt (um eine möglicher Weise begonnene Milchsäuregährung zu sistiren oder zu verhindern). Darauf wurde filtrirt und das Filtrat zurückgegossen, bis es völlig klar durch ein gewöhnliches Filtrum hindurchlief; dem Filtrate wurden dann Proben entnommen je 10 ccm. zu den verschiedenen Bestimmungen (Säurebestimmungen, Total-N und peptonisirter N). Es wurden hier, wie in allen vorbergehenden Fällen, Doppelversuche angestellt und Doppelbestimmungen vorgenommen. Die angeführten Zahlen sind in der Regel Mittelzahlen der 2 Bestimmungen. — Ebenso wenig wie ich die

einzelnen Details der Versuchsanordnung beschreiben will, werde ich die Resultate eingehender discutiren, sondern mich mit Auszügen meiner Versuchsprotokolle begnügen (eine ausführliche Bearbeitung wird später erscheinen).

Die angeführten Zahlen sind umgerechnet pr. 100 g Malz (500 cem.). Die Acidität ausgedrückt durch die Anzahl von cem. $\frac{1}{10}$ normaler Natronlauge, welche zur Neutralisation von 500 cem. der Würze ausreicht.

I. Maischen bei den gewöhnlichen Brautemperaturen.

Bei den Parallelversuchen wurde mit Chloroform gesättigt, das ja einen schwächenden Einfluss auf die Peptase hat. Wenn diese hier etwas geringer als in früheren Versuchen erscheint, kommt es sicherlich daher, dass sich in dem zerquetschten Malz viele intacte Zellen befinden, in welche das Chloroform nicht einzudringen und das Enzym zu zerstören vermag. Zum Vergleich wird ein Maischversuch bei 0° in einer Stunde (unter Umrühren) angeführt.

	Ohne Chloroform				Mit Chloroform gesättigt			
	Acidität	Total-N	Pept. N	% Pept. N	Acidität	Total-N	Pept. N	% Pept. N
		mg	mg	%				
Eiswasser 0° 1 St.	67.5	480.5	245	51.0				
1 $\frac{1}{4}$ St. bei 35°	90	561.5	329	58.6	75	456.5	303	66.4
1 $\frac{1}{4}$ St. b. 35° + 1 $\frac{1}{2}$ St. b. 50°	130	638.5	414	66.4	107	526.0	356	67.6
1 $\frac{1}{4}$ St. b. 35° + 1 $\frac{1}{2}$ St. b. 50° + 1 St. b. 62.5°	152.5	665.0	464	69.8	120	576.0	416	72.2

Man sieht demnach, dass unter dem Brauprocess eine recht bedeutende Peptonisirung stattfindet, und dass nicht allein die Menge des Totalstickstoffes, der ausgezogen wird, sondern auch die procentische Menge des peptonisirten N steigt. In den gewöhnlichen Auszügen von Grünmalz (siehe S. 85) befinden sich in der Regel nur 52—53% vom Total-

stickstoff in peptonisirtem Zustand und hier im Versuche bei 0° gleichfalls nur 51%, während diese unter dem Maischen bis auf nahezu 70% steigen, obwohl die Totalstickstoffmenge gleichzeitig bedeutend gestiegen ist. Die Menge der freien Säure spielt sicherlich hier eine wichtige Rolle (unter dem Maischen wird vielleicht durch Gährung eine geringe Menge freier Milchsäure gebildet), weil sie sowohl mehr von dem vorhandenen Eiweissstoff auflöst, als auch die Wirkung des Enzyms befördert. Hierauf deuten ebenfalls die folgenden Versuche, in welchen 0,2% Salicylsäure zugesetzt war, obwohl das Enzym bei den hohen Temperaturen hier geschwächt sein musste.

II. Maischen in 4 $\frac{1}{4}$ Stunden bei constanter Temperatur, mit und ohne Chloroform oder Salicylsäure.

	Acidität	Total-N	Pepton, N	% Pept. N	
62.5°	Ohne Zusatz	135	629.0 mg	433 mg	68.8 %
	Mit Chloroform gesättigt	125	473.5 >	328 >	69.3 %
	Mit 0.2 % Salicylsäure	167.5	698.5 >	550 >	78.7 %
70°	Ohne Zusatz	135	544.5 >	351 >	64.5 %
	Mit Chloroform gesättigt	107	407 >	264 >	64.9 %
	Mit 0.2 % Salicylsäure	170	605.5 >	409 >	67.55 %

Auch diese Versuche lasse ich vorläufig für sich selber reden.

III. In den nachfolgenden Versuchen ist untersucht worden, wie das Peptonisiren vor sich geht, wenn während der ganzen Zeit bei constanter Temperatur gemischt wird, und welche von 4 beispielsweise unter den Brauprocessen anzuwendenden Temperaturen sowohl die grösste Menge des Totalstickstoffes, als auch des peptonisirten Stickstoffes ergibt. Um den zeitgemässen Verlauf des Processes zu verfolgen, sind die Parallelversuche nach verschiedenen Zeiträumen abgebrochen worden, und zum Vergleich wird hier ein Versuch bei 0° in 4 $\frac{1}{4}$ Stunden angeführt.

Versuchsdauer		Acidität	Total-N	Pept. N	Unbeeinflusst N	% pept. N
0 ^o	4 1/4 Stunden	75	424 mg	202 mg	222 mg	47.7 %
35 ^o	1 3/4	97.5	543	274	269	50.5 %
	3 1/4	119.0	589	302	287	51.3 %
	4 1/4	122.5	593	327	266	55.1 %
50 ^o	1 3/4	115.0	590	373	217	63.2 %
	3 1/4	145.0	616	388	228	63.0 %
	4 1/4	120.0(?)	641.5	406	235.5	63.3 %
62.5 ^o	1 3/4	110.0	509	319	190	62.7 %
	3 1/4	115.0	534	343	191	64.2 %
	4 1/4	130.0	551	357	194	64.8 %
75 ^o	1 3/4	145.0	398.5	235	163.5	56.5 %
	3 1/4	137.5	435	254	181	58.4 %
	4 1/4	117.5	432	256	176	59.1 %

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass bei 50^o sowohl mehr Totalstickstoff ausgezogen als auch peptonisirter N gebildet wird als bei den anderen Temperaturen. Das stimmt mit den angeführten Versuchen überein, nach welchen das Temperaturoptimum für die Wirkung der Peptase bei 47—48^o liegt. Der Zusatz einer geringen Menge freier Säure würde sicherlich in hohem Grade das Peptonisiren beschleunigen. Einige hierüber angestellte Versuche gaben folgende Resultate:

100 g Malz + 400 ccm. Wasser	Total-N	Pept. N	Unbeeinflusst N	Pept. N	Vermehrung des		
					Total-N	Pept. N	Unbeeinflusst N
	mg	mg	mg	%	mg	mg	mg
Nach 2 Stunden bei 5 ^o	429	236	193	55.0			
2 " " " 47 ^o	624	386	238	61.8	195	150	45
100 g Malz + 400 ccm. Wasser mit 0.2% Milchsäure							
Nach 2 Stunden bei 5 ^o	458	273	185	59.6			
2 " " " 47 ^o	852	577	275	67.7	394	304	90

Es ist demnach keinem Zweifel unterworfen, dass die Peptase während des Brauprocesses wirkt und dass sie in hohem Grade für den Gehalt des Bieres an stickstoffhaltigen Bestandtheilen bestimmend ist. Die nicht peptonisirten Eiweissstoffe werden vielleicht zum grössten Theil im Hopfenkessel und durch die anderen Erwärmungsprocesse, denen die Würze und das Bier unterzogen werden, ausgefällt, jedoch bleiben da die durch den Einfluss der Peptase gebildeten Zersetzungsprodukte der Eiweissstoffe übrig, von denen ein grosser Theil zur Ernährung der Hefe gebraucht wird.

Wenn nun unter dem Maischen ein proteolytischer Process vor sich geht, ist es klar, dass das betreffende Enzym die Erwärmung, durch welche das Grünmalz zum Darrmalz wurde, ertragen hat. Ich versuchte nun, ob ein Grünmalzauszug ebenfalls das Eindampfen zur Trockne aushielt. Nach sehr beschwerlichem und langwierigem Eindampfen bis ungefähr zur Trockne im Vacuum bei 20—30 mm. Quecksilberdruck und bei einer zwischen 30° und 50° schwankenden Temperatur wurde der Extract schliesslich in 4 Tagen im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet und darauf pulverisirt. Eine Lösung von 4% dieses Pulvers peptonisirte in 1½ Stunden bei 45° von einer milchsäuren Glutininlösung 2,84 mg N, eine 8% ige Lösung ungefähr das Doppelte, nämlich 5,16 mg N. Es blieb demnach noch ein recht bedeutendes peptonisirendes Fermentirungsvermögen übrig, was sich jedoch verlor, als das Pulver 22 Stunden bei 95° gehalten worden war.

Ausser den hier genannten sind mehrere andere Verhältnisse bei den Wirkungen der Peptase untersucht, wie die Abhängigkeit der Enzymmenge und der Zeit, der Einfluss des Frierens, Alters, Lichtes und des Alkohols, ferner wie viel diffusibeler Stickstoff gebildet wird u. s. w. Da aber einige dieser Versuche noch nicht abgeschlossen sind, und mehrere von ihnen ein specielleres Interesse besitzen, habe ich dieselben hier nicht erwähnt. Da hier ausserdem eine Reihe anderer Fragen vorliegt, die der Erörterung bedürfen, und einige der schon behandelten weiter ausgeführt werden sollen, muss ich ebenfalls in Betreff der Details bei

den Versuchsanstellungen auf eine spätere ausführlichere Bearbeitung meines Themas hinweisen, welche in den Mittheilungen vom Carlsberg-Laboratorium erscheinen wird. Die hier mitgetheilten Facta dürften vielleicht auf einiges Interesse rechnen im Anschluss an die von Windisch und Schellhorn, sowie einige andere im Laufe dieses Sommers veröffentlichten Berichte.

II. Das coagulirende Enzym (Lab).

Ausser dem proteolytischen habe ich inzwischen ebenfalls ein eiweisscoagulirendes Enzym (Lab) im Malz nachgewiesen. In meinen ersten Versuchen über die Einwirkung der Peptase auf Gluten (Kleber) beobachtete ich, dass dieses sich immer wie ein Coagulum kurz nach dem Zusatz von Malzauszug sammelte, und dieses geschah fast augenblicklich, nach weniger als dem Verlauf von 5 Minuten sowohl bei 50° als auch bei gewöhnlicher Temperatur. Ich untersuchte darauf, in welcher Weise der Malzauszug auf Milch wirkte. Zu 25 cem. Milch kam 10 und 20 cem. frischer Malzauszug (aus 1 Theil zerquetschtem Malz und 2 Theilen Wasser bereitet) und zur Kontrolle 20 cem. Malzauszug, der im Voraus bis zum Kochen erwärmt war. Nach Verlauf einer Stunde war die Milch mit den 20 cem. ungekochten Malzauszug coagulirt, nach 2 Stunden die Proben mit 10 cem. Dagegen war nach ungefähr 5½ Stunden Coagulation noch nicht in der Kontrolle eingetreten. In den beiden ersten Versuchen sammelte sich das Casein auf dem Boden unter einer überstehenden klaren Flüssigkeit.

Dass die Enzymmenge hier nicht nur für die Schnelligkeit, mit welcher die Coagulation zu Stande kommt, von Bedeutung war, sondern auch entscheidend war, ob dieselbe überhaupt eintritt, zeigen folgende Versuche mit einer Kleberlösung. Die Versuche wurden bei gewöhnlicher Zimmertemperatur angestellt und begannen 3 Uhr 52 Minuten. Um 3.56 coagulirte die erste Probe, 3.58 die zweite, die dritte und vierte Probe coagulirte weder an diesem noch am folgenden Tage. An das Licht gehalten sah man die vorwärtsschreitende

Coagulation in den Gläsern mit 20 und 10 cem. und das Coagulum sammelte sich allmählich auf dem Boden, während die darüber stehende Flüssigkeit klar wurde. In den entsprechenden Versuchen bei 50°, welche vom 22. XI. 1898 4 Uhr bis 23. XI. 9.30 Vormittags dauerten, fand eine geringe Fällung in den Gläsern mit 5 und 2 cem. Malzauszug statt: die darüberstehende Flüssigkeit war jedoch nicht klar wie in den Proben mit 20 und 10 cem.: dieselbe hatte den opalisirenden Schein der Kleberlösung: wahrscheinlicher Weise war nicht genügend Enzym zugegen gewesen, um allen Kleber auszufällen.