

HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

E. ABDERHALDEN-Halle, SVANTE ARRHENIUS-Stockholm, G. v. BUNGE-Basel, A. ELLINGER-Frankfurt a. M., G. EMBDEN-Frankfurt a. M., H. EULER-Stockholm, †EMIL FISCHER-Berlin, H. FISCHER-Wien, R. GOTTLIEB-Heidelberg, W. v. GULEWITSCH-Moskau, O. HAMMARSTEN-Upsala, S. G. HEDIN-Upsala, V. HENRIQUES-Kopenhagen, G. HOPPE-SEYLER, Kiel, O. KESTNER-Hamburg, F. KNOOP-Freiburg i. Br., L. KREHL-Heidelberg, Wm. KÜSTER-Stuttgart, CARL TH. MÖRNER-Upsala, F. v. MÜLLER-München, J. P. PAWLOW-St. Petersburg, C. A. PEKELHARING-Utrecht, F. PREGL-Graz, W. E. RINGER-Utrecht, E. SALKOWSKI-Berlin, M. SIEGFRIED-Leipzig, S. P. L. SÖRENSEN-Kopenhagen, H. STEUDEL-Berlin, H. THIERFELDER-Tübingen, H. WIELAND-München, R. WILLSTÄTTER-München, A. WINDAUS-Göttingen, E. WINTERSTEIN-Zürich, R. v. ZEYNER-Prag

herausgegeben von

A. KOSSEL,

Professor der Physiologie in Heidelberg.

Einhundertundsiebenter Band:

Sechstes Heft.

(Schluß des Bandes.)

(Ausgegeben am 25. September 1919.)

Mit einer Abbildung im Text.

BERLIN und LEIPZIG 1919

VEREINIGUNG WISSENSCHAFTLICHER VERLEGER

WALTER DE GRUYTER & Co.

vormals G. J. Göschen'sche Verlagshandlung — J. Guttentag, Verlagsbuchhandlung — Georg Reimer — Karl J. Trübner — Veit & Comp.

EINHUNDERTUNDSIEBENTER BAND SECHSTES HEFT.

Inhalt.	Seite
Euler, Hans und Olof Svanberg. Versuche zur Darstellung hochaktiver Saccharasepräparate. Mit einer Figur im Text . . .	269
Winterstein, E. Über die Konstitution des Surinamins. (Berichtigung.)	314

Für die nächsten Hefte sind Arbeiten eingegangen von:

E. Fischer, Hans v. Euler und Ingvar Laurin, Else Hirschberg und Hans Winterstein (3), Else Hirschberg, R. Feulgen, O. Gerngroß, Th. Gaßmann, H. Steudel und E. Peiser, Olof Svanberg, F. Wrede.

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie erscheint in Bänden von 6 Heften. Preis des Bandes 25 Mark.

Kurze Notizen oder Bemerkungen zu anderen Arbeiten werden in der Regel am Schluß des Heftes und außerhalb der Reihenfolge des Eingangsdatums mitgeteilt. — Bereits in anderen Zeitschriften veröffentlichte Arbeiten, sowie Referate über bereits publizierte Arbeiten werden nicht aufgenommen.

Das Honorar beträgt für den Druckbogen 40 Mark. Von jeder Arbeit werden dem Verfasser 75 Separat-Abdrücke gratis geliefert.

In bezug auf die Rechtschreibung der Fachausdrücke sind bis auf weiteres die Publikationen der Deutschen chemischen Gesellschaft maßgebend. In zweifelhaften Fällen wird der etymologische und internationale Standpunkt vor dem phonetischen bevorzugt.

zur Darstellung hochaktiver Saccharasepräparate.

Von

Hans Euler und Olof Svanberg.

Mit 1 Figur im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)
(Der Redaktion zugegangen am 8. Juli 1919.)

Inhalt:

I. Einleitung S. 269. — II. Methoden S. 272. — III. Definition der Aktivität und der Inversionsfähigkeit S. 273. — IV. Unsere Versuche: A. Versuche mit Brennerei-Oberhefe SB II S. 276; B. Versuche mit Brauerei-Unterhefe H S. 286; C. Neue Saccharasepräparate aus der Hefe H S. 294. — V. Zusammenfassung S. 303. — Beilagen S. 308.

I. Einleitung.

Die Aufgabe, möglichst reine und wirksame Saccharasepräparate darzustellen, ist bereits in zwei Untersuchungen aus dem hiesigen Laboratorium behandelt worden:

Auf Grund orientierender Versuche von Euler, Lindberg und Melander¹⁾ erschien es zweckmäßig, bei der Isolierung von Saccharasepräparaten nach dem Vorgang von O'Sullivan und Tompson²⁾ von autolyzierter Hefe auszugehen. Durch fraktionierte Alkoholfällungen und darauf folgende Behandlung der Saccharaselösungen mit den Adsorptionsmitteln Kohle und Kaolin³⁾ wurde ein Präparat erhalten, dessen Wirksamkeit in folgender Weise charakterisiert ist:

¹⁾ Euler, Lindberg und Melander, Diese Zeitschr. Bd. 69, S. 152 (1910).

²⁾ O'Sullivan und Tompson, Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834 (1890).

³⁾ Michaelis, Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 489 (1907).

0,05 g Saccharasepräparat werden NaH_2PO_4 -Lösung gelöst und mit 20 ccm 20 lösung versetzt. Die Zeit, welche vergeht hebung der Multirotation durch Soda) die Dre. ist 14 Minuten. Nach der von O'Sullivan u. eingeführten Ausdrucksweise war also

$$\pm 0^\circ = 14 \text{ Minuten.}$$

Wir übergehen die Angaben über die chemische Zusammensetzung dieses Präparates, da sich später gezeigt hat, dasselbe hinsichtlich der Wirksamkeit weit übertroffen werden kann.

Die von Euler, Lindberg und Melander befolgte Arbeitsweise wurde in einer bald folgenden Untersuchung von Euler und Kullberg¹⁾ bedeutend modifiziert. In der letztgenannten Arbeit wurde folgendermaßen verfahren:

Etwa 500 ccm Autolysesaft (gewonnen durch 12tägige Autolyse von 2 kg gepresster Brauereihefe) wurden mit einer konzentrierten Lösung von 70 g Bleiacetat gefällt. Vor dem Abfiltrieren wurde die ganze Masse mit Kaolin verrieben, worauf die Mutterlauge abgesogen wurde. Dieselbe wurde nun mit Schwefelwasserstoff gesättigt, um das Blei zu entfernen. Das Filtrat wurde mit wenig Kohle und hierauf dreimal mit größeren Mengen Kaolin verrieben. Schließlich wurde mit Alkohol gefällt, wodurch 7,7 g eines rein weißen Pulvers erhalten wurden.

$$\text{Aktivität: } \pm 0^\circ = 12 \text{ Minuten.}$$

Dieses Präparat enthielt 4,59% N und 2,80% Asche.

Der größere Stickstoffgehalt dieses Präparates im Vergleich zu früher erhaltenen wurde darauf zurückgeführt, daß infolge längerer Autolyse mehr Aminosäuren und überhaupt Eiweißspaltprodukte entstanden waren, welche durch die Adsorptionsmittel schwerer entfernt werden konnten. Dementsprechend zeigte sich auch, daß ein großer Teil des Stickstoffs durch Diffusion entfernt werden konnte. Nach rund 5tägiger

¹⁾ Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 335 (1911).

freier Diffusion des Präparates wurde durch Alkoholfällung ein neues Präparat erhalten von der Aktivität

$$\pm 0^\circ = 10 \text{ Minuten}$$

und dem Stickstoffgehalt $N = 1,85\%$.

Es ist dies das beste der von Euler und Kullberg in fester Form dargestellten Präparate.

Eine weitere Reinigung einer Lösung von Saccharase wurde durch Behandlung mit kolloidalem Eisen erzielt.

„100 ccm Lösung, enthaltend 5 g Rohinvertase, wurden mit 15 ccm kolloidaler Eisenlösung vollständig gefällt. Diese Fällung wurde zuerst mit 100 ccm destilliertem Wasser behandelt, wobei nur wenig Invertase in Lösung ging und hierauf mit 20 ccm 0,05-n. HCl versetzt. Nach dem Abfiltrieren wurde mit Natronlauge neutralisiert und die Lösung wie üblich auf ihre Wirksamkeit geprüft. $\pm 0^\circ = 20$ Minuten. 5 ccm dieser Lösung enthielten 0,0148 g organische Substanz. Hieraus berechnet sich für die übliche Konzentration von 0,05 g Substanz die Aktivität: $\pm 0^\circ = 5,6$ Minuten.“

Hierzu war bemerkt worden, daß sich trotz der hohen Aktivität der so erhaltenen Präparate diese Methode zur Darstellung größerer Mengen wegen der geringen Ausbeuten an Saccharase nicht empfiehlt.

Seit der Untersuchung von Euler und Kullberg ist unseres Wissens nur eine Arbeit über das gleiche Thema veröffentlicht worden, und zwar von Meisenheimer, Gambarjan und Semper¹⁾. Diese Forscher bringen eine neue, offenbar sehr brauchbare Methode in Vorschlag, vom Hefenpreßsaft auszugehen und einen großen Teil der Eiweißkörper mit Säuren — Schwefelsäure oder Oxalsäure — auszufällen. Mit dieser Methode haben Meisenheimer und seine Mitarbeiter Präparate von einer Aktivität erhalten, welche wir aus den Daten nicht genau berechnen konnten, aber wohl auf $\pm 0^\circ = 20$ bis 10 Minuten schätzen.

Wie aus den im folgenden beschriebenen Versuchen hervorgeht, haben wir in dieser Arbeit hinsichtlich der Darstel-

¹⁾ Meisenheimer, Gambarjan und Semper, Biochem. Zeitschr. Bd. 54, S. 108 (1913).

lung eines möglichst aktiven Saccharasepräparates weitere, nicht unwesentliche Fortschritte erzielt. Unser diesmal gewonnenes bestes Präparat übertrifft das wirksamste der früheren Arbeiten um etwa 100%.

II. Methoden.

Autolyse. Die Autolyse der gepreßten Hefe, welche einen durchschnittlichen Wassergehalt von 70% besaß, geschah in großen, mit dichten Wattepropfen verschlossenen Kolben unter Zusatz von Toluol, welches öfters erneuert wurde.

Es hat sich gezeigt, daß Zeit und Temperatur am besten so gewählt werden, daß die Eiweißkörper aus dem Autolyse-saft noch möglichst vollständig gefällt oder durch Adsorption entfernt werden können. Nach einiger Zeit setzt sich ein fester, aber schleimiger Bodensatz, in welchem sich harte, kugelige Gebilde von rein weißer Farbe befinden¹⁾, unter einer klaren, braunen Flüssigkeit ab. Die Filtration des Saftes vom Rückstand macht erhebliche Schwierigkeiten; Absaugen hat sich als unmöglich erwiesen, Abzentrifugieren war mit unseren verhältnismäßig kleinen Zentrifugen auch nicht zweckmäßig. Die besten Ergebnisse erhielten wir mittels freier Filtration durch zahlreiche Faltenfilter (etwa 1 doppeltes Filter pro 50 ccm Saft).

Inversionsversuche. Diese Versuche wurden mit folgender Mischung ausgeführt:

4,8 g	Rohrzucker
10 ccm	5%ige Lösung von KH_2PO_4
45 ccm	dest. Wasser
5 ccm	Enzymlösung
60 ccm.	

Die Mischung enthielt also 8% Rohrzucker.

Die Acidität der Lösungen betrug während der Inversion $p_{\text{H}} = 4,1-4,4$, mit Methylorange und p-Nitrophenol gegen Sörensensche Standardlösungen kolorimetrisch kontrolliert.

¹⁾ Dies war besonders bei der Oberhefe SB II der Fall, während bei der Unterhefe H wenige oder gar keine Kugeln auftraten. Die Zusammensetzung der Kugeln haben wir noch nicht näher untersucht; sie bestehen jedenfalls nicht nur aus Tyrosin, wie die von Meisenheimer (Diese Zeitschr. Bd. 104, S. 232 [1919]) beschriebene Ausscheidung.

Inversionstemperatur: 15—18°.

Die Inversionsgeschwindigkeit wurde polarimetrisch gemessen mit einer Quecksilberlampe als Lichtquelle.

Von Zeit zu Zeit wurden der Versuchslösung 10 ccm entnommen, mit 10 ccm 5%iger Sodalösung vermischt und im 10-cm-Rohr polarisiert.

Der Endwert der Linksdrehung L wurde aus der maximalen Rechtsdrehung R nach der Formel berechnet: $L^0 = -R^0$ ($0,44 - 0,005 t$), wo t die Temperatur bei der polarimetrischen Ablesung bedeutet.

III. Definitionen der Aktivität und der Inversionsfähigkeit.

1. Nach O'Sullivan und Tompson wurde in früheren Mitteilungen¹⁾ die Aktivität eines Saccharasepräparates folgendermaßen ausgedrückt:

0,05 g Präparat wird in 5 ccm 0,5-n. NaH_2PO_4 gelöst und zu 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung gegeben. Die Zeit, welche verging, bis (nach Aufhebung der Multirotation durch Soda) die Drehung 0° betrug, wird ausgedrückt durch

$$0^\circ = t \text{ Minuten.}$$

2. Wir können die katalytische Wirkung eines Präparates auch durch die Inversionskonstante²⁾ ausdrücken, welche in einer Rohrzuckerlösung von bekannter Zusammensetzung erreicht wird. Die Inversionskonstante k wird bekanntlich berechnet nach der Gleichung

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{R + L}{\alpha + L}$$

wo R die Anfangsdrehung, L die Enddrehung der Lösung und α die Drehung zur Zeit t bezeichnet.

¹⁾ O'Sullivan und Tompson, Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834 (1890). — Euler, Lindberg und Melander, Diese Zeitschr. Bd. 69, S. 152 (1910). — Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 335 (1911).

²⁾ Trotz des leichten Ansteigens der Konstanten bei optimaler Acidität (siehe die Beilagen und auch Michaelis und Menten, Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 333 [1913]) stellen die Mittelwerte dieser Konstanten ein für unsere Aufgabe hinreichend genaues Maß der Aktivität dar, und bieten hier größere Sicherheit, als wenn nur die Anfangsgeschwindigkeit bestimmt würde.

In der Regel wird statt mit natürlichen mit dekadischen Logarithmen gerechnet und die Zeit in Minuten ausgedrückt.

3. Die Inversionskonstante k , dividiert durch die Konzentration des Enzympräparates ($\%$) ergibt die Aktivitätszahl $k/\%$.

4. Für die lebende Hefe haben wir in früheren Arbeiten¹⁾ die Inversionsfähigkeit $Inv.$ ausgedrückt durch die Bezeichnung

$$Inv. = \frac{k \times g \text{ Zucker}}{\text{Zellenzahl.}}$$

Hierbei müssen allerdings die Grenzen der Rohrzuckerkonzentration festgelegt werden, in welchen dieser Ausdruck von der Zuckerkonzentration unabhängig ist.

In Analogie hiermit können wir für die Inversionsfähigkeit eines Präparates oder Saftes die Beziehungen aufstellen:

$$If = \frac{k \times g \text{ Zucker}}{g \text{ Trockensubstanz}} \text{ bzw. } \frac{k \times g \text{ Zucker}}{g \text{ Präparat.}}$$

Aus der Aktivitätszahl $k/\%$ wird If erhalten durch Multiplikation mit

$$\frac{0,08}{\text{Trockensubstanz-Prozent der Enzymlösung.}}$$

Aus der O'Sullivan-Tompsonschen Zahl $\pm 0^\circ = t$ Minuten (berechnet für 4 g Rohrzucker und 0,05 g Präparat), ergibt sich If durch die Gleichung²⁾

$$If = \frac{46,176}{t}$$

Für die „Rohinvertase“ von Euler, Lindberg und Melander, deren Zeitzahl $\pm 0^\circ = 25-27$ Minuten betrug, wird also

$$If = 1,77.$$

Euler und Kullbergs Präparat, $\pm 0^\circ = 10$ Minuten ergibt

$$If = 4,62.$$

In vorliegender Arbeit haben wir erreicht (Präparat 3 G α 1, S. 303)

$$\pm 0 = 3,6 \text{ Min.}$$

$$If = 12,82.$$

¹⁾ Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 201 (1919).

²⁾ Vergl. S. 303.

Proportionalität zwischen Enzymgehalt und Aktivität des Hefesaftes.

Da in folgenden Versuchen der Enzymgehalt des Autolysesaftes aus der Aktivität proportioniert wurde, haben wir durch eine Versuchsreihe die Beziehung zwischen Gehalt einer Lösung an Autolysesaft und Inversionskonstanten festgestellt.

Versuch	Autolysesaft ccm	Wasser ccm	Beil.
1	0,2	4,8	4
2	0,05	4,95	5
3	1	4	6
4	0,5	4,5	7
5	2	3	8

Aus den erhaltenen Zahlen berechnet sich in folgender Weise die enzymatische Aktivität des Autolysesaftes.

Versuch	Saft		Konstante (k)	k/‰
	auf 60 ccm ccm	auf 100 ccm (‰)		
2	0,05	0,0833	3,04	36
1	0,2	0,333	12,5	38
4	0,5	0,833	35	42
3	1	1,67	70	42
5	2	3,33	129	39
			Mittel	<u>39</u>

Wir finden also innerhalb der Versuchsfehlergrenzen Proportionalität zwischen Gehalt der Lösungen an Autolysesaft bzw. an Saccharase und den Inversionskonstanten k.

Dies entspricht den früheren Befunden von O'Sullivan und Tompson und von Hudson, daß innerhalb gewisser Grenzen die Inversionsgeschwindigkeit der Konzentration der Saccharase proportional ist.

IV. Unsere Versuche.

A. Versuche mit Brennerei-Oberhefe S B II.

Der Saccharasegehalt der Hefe S B II ist durch folgende Messung charakterisiert:

Versuch 1.

0,28 g frische Hefe (32% Trockengewicht) gaben in 60 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung bei 17° die Inversionskonstante

$$k \cdot 10^4 = 21 \text{ (Beil. 1).}$$

Drücken wir die Aktivität A dadurch aus, daß wir die Inversionskonstante k mit dem Prozentgehalt der Lösung (g Hefe per 100 ccm) dividieren, so erhalten wir

$$A = 45.$$

Zellenzahl obiger Lösung: $0,264 \cdot 10^{10}$ Zellen. (Entsprechend $0,29 \cdot 10^{11}$ Zellen pro g Trockengewicht)¹⁾. Hieraus die Inversionsfähigkeit

$$\text{Inv.} = \frac{k \times \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}} = \frac{21 \cdot 10^{-4} \times 4,8}{0,264 \cdot 10^{10}} = 3,8 \cdot 10^{-12.1)}$$

Vergleich der Autolyse bei 18° und bei 35°.

Die Hefe von oben angegebenen Trockensubstanzgehalt wurde unter Toluolzusatz autolysiert, und zwar 14 Tage bei 18° (Zimmertemperatur) und bei 35° (im Thermostaten).

Nach dieser Zeit wurde der Saft vom festen Rückstand abgeschieden.

Versuch 1: Unvorbehandelte frische Hefe. $A = 45$ (s. oben).

Versuch 2.

Saft der Autolyse bei 35°
1 ccm Saft in 60 ccm Lösung.

8% Rohrzucker.

$$k \cdot 10^4 = 47 \text{ (Beil. 2),}$$

$$A = k/\% = \frac{47}{1,67} = 28.$$

Versuch 3.

Saft der Autolyse bei 18°
1 ccm Saft in 60 ccm Lösung.

8% Rohrzucker.

$$k \cdot 10^4 = 62 \text{ (Beil. 3),}$$

$$A = k/\% = \frac{62}{1,67} = 37.$$

¹⁾ Vergl. Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 201 (1919).

Der Vergleich der Versuche 2 und 3 zeigt, daß durch Autolyse bei Zimmertemperatur ein wirksamerer Autolysesaft erhalten wurde als bei höherer Temperatur.

Vergleicht man die Werte $A = k/\%$ die in Versuch 1 für die frische Hefe, und in Versuch 2 und 3 für die Autolysesäfte erhalten wurden, so sieht man, daß nicht der gesamte Saccharasegehalt in den Saft übergeht.

Ausbeute an wirksamem Saft.

Die größten Verluste hinsichtlich der Saccharaseausbeute sind indessen dadurch verursacht, daß bei der Filtration vom festen Rückstand bei weitem nicht der gesamte Saft gewonnen wird, sondern auf den Filtern ein Brei hinterbleibt, welcher bedeutende Saftmengen enthält.

Aus 1 kg frischer Hefe werden somit nicht mehr als etwa 300 ccm Saft erhalten, in welchem man $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{5}$ der gesamten Saccharasewirkung der frischen Hefe wiederfindet.

Ausbeutebestimmung bei der Autolyse der Oberhefe.

A. 10 kg Oberhefe, autolysiert 20 Tage bei 30—35°.

Ausbeute: 3040 ccm.

Inversionskonstanten: bei verschiedenen Verdünnungen bestimmt (s. S. 275, Beil. 4—8)

$$k/\% = 39.$$

B. 10 kg Oberhefe, autolysiert bei Zimmertemperatur.

Ausbeute 1: 1850 ccm hellerer, weniger klarer Saft,

„ 2: 800 ccm dunkler, durchsichtiger Saft,

2650 ccm.

Trockensubstanzgehalt der Rückstände: 32,6%.

Versuch 1: 1 ccm Saft auf 60 ccm = 1,67%

$$k \cdot 10^4 = 99 \text{ (Beil. 10)}, k/\% = 99/1,67 = 59,5.$$

Versuch 2: 1 ccm Saft auf 60 ccm = 1,67%.

$$k \cdot 10^4 = 76 \text{ (Beil. 11)}, k/\% = 76/1,67 = 45,5.$$

Ein Vergleich der Werte $k/\%$ für die Autolysetemperaturen 35° und 18° zeigt wieder, daß bei Zimmertemperatur ein wirksamerer Saft gewonnen wird.

Aktivitätsbestimmung der breiigen Rückstände.

Wegen der Unmöglichkeit, die Rückstände bis zur Klarheit abzufiltrieren, wurde die Inversion bei diesen Versuchen durch reduktionsanalytische Bestimmungen des Invertzuckers nach Bertrand ausgeführt. Die Versuchslösung war dieselbe wie bei den Versuchen 1—5 (s. S. 275). Von dem Hefebrei wurde 0,86 g auf ein Stück Filtrierpapier abgewogen. Von Zeit zu Zeit wurden 2 ccm der Versuchslösung entnommen (Doppelproben), in 18 ccm 5%iges Soda im Reduktionskolben eingeführt und reduziert.

$$k \cdot 10^4 = 44,8 \text{ (Beil. 9),}$$

$$\text{Präparat auf 100 ccm (\%)} \frac{0,86 \cdot 100}{60} = 1,43.$$

$$\text{Aktivität (k/\%)} = 31,4.$$

Die Aktivität der Rückstände ist also 20% kleiner als diejenige des Filtrates ($100 \text{ k/\%} = 39$, vergl. oben).

Alkoholfällung.

Zu einem orientierenden Versuch über die bei der Alkoholfällung sich ergebende Ausbeute wurden nun die drei erwähnten Säfte vereint.

Volumen ccm	Aktivität $k, \%$	Umgerechnet auf 5690 ccm	Autolysiert bei
3040	39	20,8	35°
1850	56,5	18,4	16°
800	45,5	6,4	16°
<u>5690</u>	45,5	<u>(45,6)</u>	

Fällung I.

Alkohol bis 48% .
1 Liter Alkohol + 1 Liter Autolysesaft bei Zimmertemperatur unter Umrühren mit Motor.

Fällung II.

Alkohol bis 39% .
500 ccm Alkohol + 1 Liter Autolysesaft + 200 ccm Alkohol.

Fällung I.

Die Fällung konnte sich bei -5° absetzen während $2\frac{1}{2}$ Stunden; darnach Abdekantieren der wäßrig alkoholischen Lösung unter schnellem Aufschlemmen der Fällung mit 500 ccm destillierten Wassers.

Die abdekantierte alkoholische Lösung (48% Alkohol) wurde auf ihre Aktivität geprüft. Zu 60 ccm Inversionsmischung 10 ccm der Lösung. Beil. 12. Keine Inversion.

Die wäßrige Aufschlemmung stand über Nacht, wurde $\frac{1}{2}$ Stunde lang gerührt und filtriert. Dabei wurden erhalten:

800 ccm Wasserlösung I mit 18% Alkohol. 8,1% Trockensubstanz.

Inversionsbestimmung: $k \cdot 10^4 = 183$ (Beil. 14).

Prozentzahl der Enzymlösung 3,33

$$\frac{k}{\%} = \frac{183}{3,33} = 55.$$

Die Wasserlösungen I und II wurden gemischt (Σ 1400 ccm, 50 ccm zur Trockengewichtsbestimmung) und mit Alkohol bis 50% gefällt.

700 ccm 96%iger Alkohol + Wasserlösungen + 400 ccm Alkohol: klebrige Fällung. Vollständige Dekantierung und Filtrierung vom Alkohol. Die klebrige Fällung wurde mit

Fällung II.

Behandelt wie Fällung I.

Behandelt wie Fällung I, aber 39% Alkohol.

Beil. 13. Keine Inversion der alkoholischen Lösung.

Jedenfalls höchstens $\frac{1}{1000}$ der Aktivität des Autolysesaftes.

Wie bei I.

650 ccm Wasserlösung II mit ca. 8% Alkohol. 7,7% Trockensubstanzgehalt.

Inversionsbestimmung: $k \cdot 10^4 = 199$ (Beil. 15).

Prozentzahl der Enzymlösung 3,33

$$\frac{k}{\%} = \frac{199}{3,33} = 60.$$

300 ccm destillierten Wassers aufgenommen, wurde $\frac{1}{2}$ Stunde gerührt und von einem sehr kleinen Rest abfiltriert.

Hierbei wurde Wasserlösung 3 (mit höchstens 8% Alkohol) erhalten, 360 ccm, 13,1% Trockensubstanzgehalt.

Inversionsbestimmung: (Beil. 16) $k = 156$ $k/\% = 187$

Übersicht:

	Volumen ccm	Aktivität k/%	Volum. × Aktiv.	% Trocken- substanz	g Trocken- substanz	k·g Zuck. g Präpar.
--	----------------	------------------	-----------------------	------------------------	------------------------	------------------------

1.

Autolysesaft	1000	45,5	45500	19,4	194	0,19
Wasser- lösung I	800	55	44000	8,1	65	0,54
		Ausbeute	96,5%			

2.

Autolysesaft	1000	45,5	45500	19,4	194	0,19
Wasser- lösung II	650	60	39000	7,7	50	0,62
		Ausbeute	86%			

3.

Wasser- lösung I + II	1400	(57)	80000	7,9	111	0,58
Wasser- lösung 3	360	187	67000	13,1	42	1,14
		Ausbeute	84%			

1.—3.

Autolysesaft	2000	45,5	91000	19,4	388	0,19
Wasser- lösung 3	360	187	67000	13,1	42	1,14
		Ausbeute	74%	(4% verwendet zur Trockensubstanzbestimmung der Wasserlösung I und II.) Ausbeute also 78%.		

3650 ccm Autolysesaft wurden auf demselben Wege behandelt wie Autolysesaft → Wasserlösung I → Wasserlösung 3, also 2 mal Fällung mit 48% igem Alkohol und Auflösung in

geringer Menge destillierten Wassers und Filtrierung — in zwei größeren Portionen,

Resultat in Zusammenfassung:

	Vol.	k/‰	Vol. k/‰	Trockensubstanz		
				%	g	If
Autolysesaft	3650	45,5	166000	19,4	710	0,19
Wasserlösung 3b	670	206 ¹⁾	138000	15,4	108	1,07
Ausbeute 83%						

Diffusionsversuch der Wasserlösung 3.

100 ccm der Lösung wurden 24 Stunden dialysiert, erst in 2, danach in 6 dünnen Collodiumhülsen mit fließendem Wasser.

Resultat:

	Vol. ccm	k/‰	Vol. k/‰	% Trockensubstanz	g Trockensubstanz	If
Wasserlösung 3	100	187	187000	13,1	13,1	1,14
Dialysrückstand	265	72	191000	3,65	9,7	1,58
Volum	beinahe 3fach		Ausbeute quantitativ		26% der Trockensubstanz wegdiffundiert, worunter der gelbe Farbstoff	

Aktivitätsbestimmung des Rückstandes der Dialyse.

1,5 ccm Rückstand auf 60 ccm, Prozentgehalt der Enzymlösung also 2,5.

Beil. 18. $k \cdot 10^4 = 179$ $k/‰ = 179/2,5 = 72.$

Ein Adsorptionsversuch mit Kaolin gab kein bemerkenswertes Resultat; 21% der Trockensubstanz waren absorbiert.

¹⁾ Aktivitätsbestimmung der Wasserlösung 3b.

0,5 ccm Wasserlösung 3b auf 60 ccm, Prozentzahl der Enzymlösung also 0,833.

Beil. 17. $k \cdot 10^4 = 172$ $k/‰ = 206.$

Wäßrige Lösung 3; Versuch zur weiteren Fällung mit Alkohol.

100 ccm der „wäßrigen Lösung 3“ (siehe S. 280) wurden unter Umrühren in 300 ccm 96%igen Alkohols eingegossen. Es entstand eine klebrige, typische Alkoholfällung, welche $\frac{1}{2}$ Stunde mit dem Alkohol bearbeitet wurde; dieser wurde dann abdekantiert. Die Fällung löste sich nahezu quantitativ in 80 ccm destillierten Wassers. Die Lösung, „wäßrige Lösung 4“, wurde in Bezug auf ihren Gehalt an Trockensubstanz und ihre Aktivität untersucht.

	Vol. ccm	Aktivität k/%	Volumen \times Aktivität	% Trocken- substanz	g Trocken- substanz	If
Wäßrige Lösung 3	100	187	18700	13,1	13,1	1,14
Wäßrige Lösung 4 ¹⁾	90	208	18720	13,1	11,8	1,27
			Ausbeute quantitativ			

Durch zwei aufeinanderfolgende Alkoholfällungen nach dieser Methode kommt man also praktisch zu einer Grenze der Reinigung des Autolysesaftes.

(Die wäßrige Lösung 4 wurde später zu ergebnislosen Versuchen mit Bleiacetat verbraucht.)

Versuch zur weiteren Reinigung der „wäßrigen Lösung 3b“; Darstellung des Trockenpräparates A.

50 ccm der oben erwähnten wäßrigen Lösung 3b (If = 1,07) wurde mit 10 ccm einer 4%igen wäßrigen Lösung von Ponceau 3 R behandelt. Es entstand eine Fällung, welche abfiltriert wurde; das Filtrat liefert durch erneuten Zusatz von Ponceau-Lösung keine weitere Fällung mehr.

¹⁾ Beilage 19. 0,5 ccm wäßrige Lösung 4 zu 60 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung = 0,833%. Enzymlösung k = 173

$$\frac{k}{\%} = \frac{173}{0,833} = 208.$$

Aktivitätsbestimmung (Beil. 20):

0,6 ccm Filtrat nach dem Zusatz der Farbstofflösung zu 60 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung.

0,6 ccm nach Farbstoffzusatz $k \cdot 10^4 = 169$ (Beil. 20)

0,5 ccm vor „ $k \cdot 10^4 = 172$ („ 17)

Durch Zusatz des Farbstoffes trat also kein Verlust an Aktivität ein; Saccharase wurde also durch den Farbstoff nicht adsorbiert bzw. ausgefällt.

Die Lösung 3b wurde nach der Ponceau-Fällung filtriert und gab 41 ccm roten Saft (großer Verlust beim Filtrieren, 31%). Diese 41 ccm wurden mit 80 ccm 96%igem Alkohol gefällt und die Fällung wurde mit 25 ccm destillierten Wassers aufgenommen. Diese wäßrige Lösung wurde unter Umrühren und Reiben mit 750 ccm 96%igem Alkohol gefällt; die Fällung wurde abgesogen und mit etwas absolutem Alkohol und wenig, wasserfreiem Äther gewaschen, sowie schließlich im Vakuumexsikkator getrocknet.

Ausbeute:

5,003 g rein weißes Pulver; Präparat A.

Diese 5,003 g enthalten 65% des Ausgangsmaterials (50 ccm wäßrige Lösung 3b enthielten 7,70 g Trockensubstanz) an Trockensubstanz, und da die Filtrationsverluste 32% betragen (siehe oben), so kann das Präparat A höchstens 3% reiner sein als die wäßrige Lösung 3b.

Aktivitätsbestimmung an Präparat A:

0,1094 g Präparat A wurden in 35 ccm dest. Wassers gelöst. 25 ccm dieser Lösung = 0,078 g Präparat zu 60 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung.

$k \cdot 10^4 = 162$ (Beil. 21).

$$\text{If} = \frac{k \times \text{g Zucker}}{\text{g Substanz}} = \frac{162 \times 4,8 \cdot 10^{-4}}{0,078} = 1,00.$$

$\pm 0 = 46,2$ Min.

Im Ausgangsmaterial (Lösung 3b) war If = 1,07.

Reduktionsversuche am Präparat A.

Wird Präparat A in 4-n. Salzsäure unter gelinder Erwärmung gelöst, so zeigt diese Lösung, nach dem Verfahren von Bertrand behandelt, keine Reduktion.

Um eine weitgehende Hydrolyse zu erzielen, wurde 0,463 g des Präparates A in 20 ccm dest. Wassers unter Zusatz von 1 ccm konz. H_2SO_4 gelöst und auf dem Wasserbad im verschlossenen Gefäß erhitzt. Von Zeit zu Zeit wurden Proben zu je 1 ccm herausgenommen und der Reduktionsprobe nach Bertrand unterworfen.

Hydrolyse in Stunden	1 ccm verbraucht $KMnO_4$ (1 ccm Permanganat- lösung = 8,7 mg Cu)	g Zucker (als Glukose) in 20 ccm
5	3,35	0,290
5	3,40	0,294
10	3,40	0,294
10	3,35	0,290

Nach Euler und Fodor¹⁾ gaben

3,2 g Hefengummi	3,73 g Hexose als Glukose berechnet,
also 0,463 g „	0,54 g „ „ „
0,463 g Präparat A	0,29 g.

Die Reduktion des Präparates A würde also hiernach einem Gehalt von 54% Hefengummi entsprechen.

Stickstoffbestimmung am Präparat A nach Kjeldahl.

0,8014 g Substanz entspr. 6,20 ccm einer 0,169-n. Barytlösung:	1,83% N
0,4902 g „ „ 3,85 ccm „ 0,169-n. „	1,86% N

Der hier gefundene mittlere Stickstoffgehalt

1,845% N

entspricht dem Stickstoffgehalt, welchen Euler und Kullberg²⁾ in dem besten diesbezüglich untersuchten Präparat festgestellt haben.

Vergärungsversuche am Präparat A.

Die Vergärungsversuche wurden mit der Hefe SB II angestellt, also mit der gleichen Hefe, aus welcher das Präparat selbst dargestellt worden ist.

0,95 g des Präparates wurden in 20 ccm Wasser gelöst; in dieser Lösung wurden 0,75 g frische Hefe aufgeschlemmt. Der Versuch wurde in einem mit Meißl-Ventil versehenen 100-cm-Erlenmeyer-Kolben ausgeführt bei 24°.

¹⁾ Euler und Fodor, Diese Zeitschr. Bd. 72, S. 339 (1911). — Siehe auch Meigen und Spreng, Diese Zeitschr. Bd. 55, S. 48 (1908).

²⁾ Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 335 (1911).

Gewicht bei Beginn der Gärung: 87,50 g
nach 31 Stunden: 87,50 g

Eine Gewichtsabnahme, welche auf Gärung zurückgeführt werden konnte, hatte also nicht stattgefunden.

Spaltungsversuche mit Mikroorganismen.

Es erschien möglich, eine biologische Reinigung bzw. Verbesserung unseres Saccharasepräparates dadurch zu erzielen, daß die nichtaktiven Bestandteile auswählend von Mikroorganismen zerlegt werden; in erster Linie würde es sich hier um die Hydrolyse des Hefengummis und der verwandten Kohlehydrate handeln.

6%ige Lösungen des Präparates A wurden der Selbstinfektion ausgesetzt, und zwar mit

1. einem Penicillium oder einem verwandten Schimmelpilz; derselbe bildete kräftig grüne Sporen, hatte weißes Mycel und entwickelte sich kräftig an der Oberfläche der Lösung;
2. einer farblosen Torulaart (?), welche sich am Boden des Kolbens in kleinen, unbedeutenden, runden Kolonien entwickelte;
3. einer Coli-ähnlichen Bakterienart von Kokken- oder Ovoidform.

Durch keine dieser Infektionen war indessen eine Hydrolyse des Hefengummis oder anderer Kohlehydrate eingetreten. Die Filtrate reduzierten nach anhaltendem Kochen Fehlings Lösung nicht und gaben mit alkalischer Kupferlösung unverändert die bekannte Fällung des Hefengummis. Die am kräftigsten entwickelte Penicilliuminfektion hatte aus einer Lösung von 10,3 g Trockensubstanz nur 0,6 g aufgenommen. Die Saccharasewirkung des Filtrates zeigte sich andererseits nach 4wöchentlicher Kultur bei Zimmertemperatur fast ungeschwächt.

Nach diesen Ergebnissen war es auch wenig aussichtsvoll, mit größeren Mengen eines Mycelkuchens von Schimmelpilzen unter Zusatz von Protoplasmagift nach der Methode von Pringsheim Hydrolyseversuche anzustellen. Immerhin werden solche Reinigungsversuche noch nachgeholt.

Ausschüttelversuche mit Äther.

25 ccm Enzymlösung wurden mit 30 ccm Äther ausgeschüttelt.

Wenn auch die bereits vorliegenden Erfahrungen an Saccharase eine größere Löslichkeit des Enzyms in Äthyläther ausschlossen, so war immerhin die Möglichkeit gegeben, auch bei geringer Löslichkeit des Enzyms in diesem Lösungsmittel eine Reinigung des Präparates zu erzielen.

Die Aktivität der wäßrigen Enzymlösung nahm mit 16% ab.

10 ccm der Ätherschicht wurden im Vakuum verdampft, der kleine Rest wurde mit 10 ccm dest. Wassers aufgenommen. Diese wäßrige Lösung zeigte indessen keine Spur einer Saccharasewirkung.

Adsorptionsversuch mit Fett.

In einer im Laboratorium Willstätters ausgeführten Untersuchung über Reindarstellung von Katalase hat Madinaveitia¹⁾ bei Adsorptionsversuchen mit Fett gewisse Erfolge erzielt. Wenn auch, wie der eine von uns früher hervorgehoben hat, die Katalase zum Fett in besonderer Beziehung zu stehen scheint²⁾, so erschien die genannte Methode von Willstätter-Madinaveitia immerhin aussichtsvoll genug, um einen Versuch auch mit Saccharase zu rechtfertigen.

25 ccm der Lösung 3b wurde mit 5 ccm einer 10%igen Lösung von chinesischem Pflanzenfett (Stillingiafett, im wesentlichen Tripalmitin) in Äther, also mit 0,5 g Fett geschüttelt. Es wurde leicht durch Umschütteln eine Fettsuspension erhalten, welche filtriert wurde. Das Filtrat enthielt die gesamte Saccharasewirkung ungeschwächt, und es können also nur minimale Mengen Enzym vom Fett absorbiert worden sein.

B. Versuche mit Brauerei-Unterhefe H

(St. Eriks-Brauerei).

Vorbehandlung der Unterhefe H.

Die im folgenden beschriebene Enzymanreicherung der Hefe H wurde in der Versuchsanlage der St. Eriksbrauerei ausgeführt.

75 Liter der Hefe H wurden mit 500 Liter Wasser von 25° in einem 700 Liter fassenden und mit Rührpropeller versehenen Maischbottich gemischt. Die Hefe konnte sich während 20 Stunden absetzen, worauf das Waschwasser mittels Heber entfernt wurde. Die Hefe wurde nun in einen 500 Liter fassenden Bottich mit Wasser von 27° übergespült. In diesem Bottich wurde nun unter Umrühren folgende Lösung zugesetzt:

0,1	kg	MgSO ₄
1,0	kg	KH ₂ PO ₄
1,0	kg	NH ₄ H ₂ PO ₄
0,05	kg	NH ₄ Cl
0,05	kg	K ₂ SO ₄
Hefenwasser aus 1/2 kg Trockenhefe		
10	kg	Invertzucker
<hr/>		
10	Liter.	

¹⁾ Madinaveitia, Zur Kenntnis der Katalase. Dissert. Zürich 1912.

²⁾ Euler, Hofm. Beitr. 7, S. 1 (1905).

Diese Lösung wurde in drei Portionen zugesetzt, nämlich um 6.30 Uhr vorm., um 11 Uhr vorm. und um 4 Uhr nachm.

Die Maische wurde während 12 Gärstunden zwischen 24 und 27° gehalten.

Nachdem sich die Hefe während 24 Stunden abgesetzt hatte, wurde die Maische mittels Heber entfernt, die Hefe wurde möglichst quantitativ gesammelt und mittels einer Handpresse abgepreßt.

Ausbeute: 20 kg Hefe von 31,3% Trockensubstanz.

Aktivitätsbestimmung:

60 ccm 8%ige Rohrzuckerlösung (4,8 g Zucker). Zellenzahl: $0,198 \cdot 10^{10}$.

$k \cdot 10^4 = 80$ (Beil. 22), Zellenzahl $0,198 \cdot 10^{10}$.

$$\text{Inv.} = \frac{k \cdot \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}} = 19,4 \cdot 10^{-12}.$$

Für die unvorbehandelte Hefe war gefunden worden:

$$\text{Inv.} = 8,0 \cdot 10^{-12}^1),$$

es ist also durch die Vorbehandlung eine Enzymanreicherung im Verhältnis 1 : 2,4 erzielt worden.

Darstellung der Lösung 3 H aus 20 kg Unterhefe H.

Die Hefe wurde auf 15 3-Literkolben verteilt, welche mit je 50 ccm Toluol versetzt wurden. Die Autolyse geschah bei Zimmertemperatur; der Toluolzusatz wurde von Zeit zu Zeit ergänzt.

Nach 14tägiger Autolyse wurde der klare Autolysesaft abfiltriert, und zwar in der gleichen Weise wie S. 272 angegeben. Der Saft war bedeutend dunkler gefärbt als der aus Oberhefe S B II erhaltene. Das Volumen der vereinigten Filtrate betrug

3850 ccm.

Die breiigen Rückstände wurden mit Kieselguhr verrührt und abgepreßt. Hierbei wurde noch etwa 1 Liter Saft erhalten. Die ersten Filtrate waren indessen 40% aktiver, weshalb sie allein zur weiteren Verarbeitung kamen.

¹⁾ Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 201 (1919).

Aktivitätsbestimmung des Filtrats:

0,5 ccm 0,021 g Trockensubstanz auf 60 ccm mit 4,8 g Rohrzucker.

$$k \cdot 10^4 = 170 \text{ (Beil. 25)}$$

$$\text{If} = \frac{170 \cdot 10^{-4} \cdot 4,8}{0,021} = 3,89$$

$$t_0 = 11,9 \text{ Minuten.}$$

Bei diesem Adsorptionsversuch war $p_H = 6,5$.

B.

Obiger Versuch wurde ergänzt durch einen zweiten, welcher in saurerer Lösung und mit weniger Kaolin ausgeführt wurde.

50 ccm rohe Lösung 3 H wurden mit 1,5 ccm 4-n. Essigsäure auf die Acidität $p_H = 3,9$ gebracht, und hierauf mit 20 g feuchten Kaolins wie oben behandelt.

60 ccm rohe Enzymlös. 3 H (7,0% Trockensubst.) entspr. 3,5 g Substanz
 60 ccm Filtrat (5,0% " ") " 3,0 g

Aktivitätsbestimmung des Filtrats:

0,5 ccm 0,025 g Trockensubst. auf 60 ccm mit 4,8 g Rohrzucker.

$$k \cdot 10^4 = 203 \text{ (Beil. 26)}$$

$$\text{If} = 3,90$$

$$t_0 = 11,9 \text{ Minuten.}$$

In beiden Versuchen war durch die Kaolinbehandlung etwa 10% an Inversionsfähigkeit gewonnen worden.

$$\text{Rohsaft If} = 3,63$$

$$\text{Nach Adsorption A If} = 3,89$$

$$\text{„ „ B If} = 3,90$$

Koagulierbares Eiweiß scheint durch die Kaolinbehandlung ziemlich quantitativ entfernt worden zu sein; nach der Adsorption trat keine Koagulation durch Erhitzen mehr ein.

Dialyseversuche durch Kollodiummembrane.

50 ccm Lösung 3 H wurde während 24 Stunden im laufenden Wasser von etwa 8° dialysiert. Während der Dialyse wuchs das Volumen allmählich auf 105 ccm an.

Trockensubstanzgehalt der Lösung nach der Dialyse: 2,4%.

Aktivität der dialysierten Lösung:

1 ccm Lösung = 0,024 g Trockensubst. auf 60 ccm mit 4,8 g Rohrzucker

$$k \cdot 10^4 = 184 \text{ (Beil. 27)}$$

$$\text{If} = 3,68$$

$$t_0 = 12,5 \text{ Minuten.}$$

Die Aktivität war also durch die Dialyse nur sehr wenig verbessert worden.

Adsorptionsversuch mit Aluminiumhydroxyd.

50 g AlCl_3 krist. wurden in 2 Liter destillierten Wassers gelöst und mit 70 ccm konz. Ammoniak bis zur schwachen Rotfärbung des Phenolphthaleins gefällt. Man ließ die Fällung sich absetzen, bis etwa die Hälfte der Lösung abdekantiert werden konnte.

100 ccm der so erhaltenen Aufschlemmung, enthaltend etwa 4 g Al(OH)_3 , wurde mit den vereinigten Resten der obigen Adsorptionsversuche, welche 95 ccm betragen, vereinigt. Die Acidität der Mischung entsprach etwa $\text{pH} = 7,5$. Nach gründlicher Mischung wurde durch Faltenfilter filtriert, das Aluminiumhydrat wurde einmal mit dest. Wasser gewaschen und dann in 200 ccm 0,1-n. HCl gelöst. Ungelöste Rückstände und Filtrierpapierteile wurden abzentrifugiert und die erhaltene Lösung wurde bei optimalem pH auf ihre Aktivität geprüft.

1 ccm Lösung auf 60 ccm 8%ige Rohrzuckerlösung.

$$k \cdot 10^4 = 28,6 \text{ (Beil. 28)}$$

$$k/\% = 28,6/1,67 = 17,1.$$

Der Wert $k/\%$ betrug für das Ausgangsmaterial 225. Durch das Aluminiumhydroxyd waren also nur 16% der Saccharase erhalten worden.

Ein Teil der Saccharase befand sich im Filtrat nach der Al-Adsorption. Dies ging aus folgendem Versuch 2 hervor.

50 ccm Saft wurden während 1 Stunde mit 50 ccm der oben beschriebenen Al(OH)_3 -Aufschlemmung unter Umrühren belassen. Nach Abfiltrieren des Aluminiumhydroxyds konnten im Filtrat 59% der ursprünglichen Saccharasemenge nachgewiesen werden.

Das Filtrat wurde mit dem gleichen Volumen 96%igen Alkohols gefällt, die Fällung wurde mit 12 ccm destillierten Wassers aufgenommen. Die so erhaltene Lösung wurde auf Aktivität geprüft.

0,5 ccm = 0,0397 g auf 60 ccm mit 4,8 g Rohrzucker.

$$k \cdot 10^4 = 295 \text{ (Beil. 29)}$$

$$I_f = 3,56$$

$$\pm 0^0 = 13 \text{ Minuten.}$$

Das Aluminiumhydroxyd zeigte also kein selektives Adsorptionsvermögen, weder gegen die Saccharase noch gegen die inaktiven Begleit-substanzen derselben; die Aktivität des eben beschriebenen Präparates ist nämlich genau so groß wie diejenige des Ausgangspräparates. Indessen war ein bedeutender Substanzverlust eingetreten.

Darstellung des Trockenpräparates H.

100 ccm des Saftes 3 H wurden mit 3 ccm 4-n. Essigsäure versetzt, worauf die Acidität der Lösung $\text{pH} = 4,0$

entsprach; dann wurde unter fleißigem Umrühren und Reiben mit 1,6 Liter 96%igem Alkohol gefällt. Die Fällung wurde noch in Mörsern verrieben, abgesogen, mit absolutem Alkohol und etwas wasserfreiem Äther gewaschen und im Vakuum-exsikkator getrocknet. 100 ccm Saft 3 H enthielten 7,0 g Trockensubstanz, die Ausbeute betrug 6,71 g (96%).

Aktivitätsbestimmung:

0.022 g Präparat auf 60 ccm mit 4,8 g Rohrzucker.

$$k \cdot 10^4 = 155 \text{ (Beil. 30),}$$

$$I_f = 3,38,$$

$$t_0 = 13,7 \text{ Minuten.}$$

Saure Hydrolyse des Präparates H und Reduktionsversuch.

0,3260 g Präparat + 20 ccm dest. Wasser + 1 ccm. konz. Schwefelsäure wurden auf dem Wasserbad, im verschlossenen Gefäß 6 Stunden erhitzt. Die Hefengummireaktion mit alkalischer Fehlingscher Lösung war nun quantitativ verschwunden.

2 ccm Lösung entsprach 18,8 mg Hexose (Glukose) nach Bertrand,

2 ccm " " 0,310 g Präparat;

demgemäß würden 100 g Präparat 61 g Hexose entsprechen bzw. ebenso reduzieren wie 52 g hydrolysiertes Hefengummi.

Stickstoffbestimmung des Präparates H nach Kjeldahl.

0,3196 g Präparat entsprach 3,50 ccm 0,169-n. NaOH = 2,60% N,

0,3891 g " " 4,50 ccm 0,169-n. NaOH = 2,74% N.

Mittel: 2,67% N¹⁾.

Bezüglich der Löslichkeit des Präparates ist anzuführen: Glycerin erzeugte auch in unseren stärksten Saccharaselösungen selbst bei 10fachem Überschuß keine Fällung. Das trockene Präparat wird quantitativ von Glycerin gelöst, somit nicht nur der Hefengummi. Aceton und Äthylacetat lösen aus dem trockenen Präparat nichts. Aus der wässrigen Lösung wird das Präparat durch Aceton ebenso wie durch Alkohol gefällt, aus Glycerinlösung dagegen erst nach Zugabe von Alkohol, wodurch eine homogene Mischung Alkohol-Aceton-Glycerin entsteht.

In diesem Zusammenhang mag auch noch ein Versuch erwähnt werden. den Hefengummi aus der Saccharaselösung mittels Fehlingscher

¹⁾ Vergl. Meigen und Spreng l. c.

Lösung auszufällen. Bekanntlich wird Hefengummi durch Fehlingsche Lösung beim Erwärmen gefällt¹⁾. Es war die Möglichkeit gegeben, daß auch bei genügend tiefer Temperatur diese Ausfällung gelingt, ohne daß eine wesentliche Zerstörung der Saccharase durch das freie Alkali der Lösung eintritt. (In neutraler Lösung haben Oshima²⁾ und Hafner³⁾ Reinigungsversuche mit Kupferacetat angestellt, welche indessen zu keinem positiven Resultat geführt haben.)

Es wurden gemischt:

- 10 ccm Kupfersulfatlösung (Lösung I nach Bertrand),
- 10 ccm neutrale Seignettesalzlösung (20 g auf 100 ccm),
- 10 ccm 2-n. NaOH.

Diese Mischung wurde auf 0° abgekühlt.

36 ccm Saft 3 H, ebenfalls auf 0° abgekühlt, wurde heftig mit obiger Mischung verrührt, wodurch eine voluminöse Gummifällung entstand. Die Mutterlauge wurde rasch abdekantiert, filtriert und mit 5 ccm 4-n. Essigsäure bis zur schwachsauren Reaktion versetzt.

Die Fällung wurde einmal mit dest. Wasser versetzt, dekantiert, vom Überschuß von Alkali befreit, in dest. Wasser + 4-n. Essigsäure gelöst. Hierbei wurde eine blaugrüne Lösung erhalten, welche höchstens eine minimale Aktivität besaß.

Das Filtrat zeigte dagegen 39% der Ausgangsaktivität, enthielt aber noch beträchtliche Mengen fällbaren Gummis und vermutlich die Gesamtmenge der stickstoffhaltigen Verunreinigungen.

Bei einer *Mycoderma*-Hefe⁴⁾ war Mangel der Saccharase festgestellt worden. Wir haben untersucht, ob mit dem Mangel an diesem Enzym auch ein Ausbleiben der Hefegummi-reaktion verknüpft sei. 5 Liter Würze wurden auf Kolben verteilt, sterilisiert und mit *Mycoderma* geimpft. Nach Ausbildung dicker Kahmhäute wurde die Hefe abgeschleudert, sie betrug 47,2 g bei 20% Trockensubstanz. Sie wurde bei Toluolzusatz bei Zimmertemperatur autolysiert. Während der Autolyse besonders starke Selbstgärung, auf einen großen Glykogenvorrat hindeutend. Nach dreiwöchentlicher Autolyse wurde die verflüssigte Hefenmasse filtriert und der erhaltene Saft zweimal mit Alkohol gefällt und mit absolutem Alkohol

¹⁾ Siehe hierzu Chem. Ber. Bd. 27, S. 499 (1894); Diese Zeitschr. Bd. 31, S. 316 (1901) und Bd. 61, S. 124 (1909).

²⁾ Oshima, Diese Zeitschr. Bd. 36, S. 42 (1902).

³⁾ Hafner, Diese Zeitschr. Bd. 42, S. 26 (1904).

⁴⁾ Vougt, Zeitschr. f. technische Biologie Bd. 1 (1919).

+ absolutem Äther getrocknet, wobei 0,091 g eines weißen Pulvers erhalten wurde, das bei Eintragen in Fehlingsche Lösung nach Bertrand (I + II) die Hefegummireaktion zeigte. 0,080 g des Präparates wurden bei + 48° auf Saccharaseaktivität geprüft, wobei aber der Drehungsrückgang von derjenigen einer Blindprobe sich wenig unterschied (2,65° bei $t = 0$; 2,43° nach 9 Stunden).

Anhang.

Verteilung der Saccharase bei der Plasmolyse der Unterhefe H durch Glycerin.

Gelegentlich ist vorgeschlagen worden, Invertasepräparate aus Plasmolysesäften der Hefe darzustellen. Obwohl mit dieser Methode bis jetzt noch keine bemerkenswerten Erfolge erzielt worden sind, haben wir uns durch einen Versuch davon überzeugen wollen, wieviel von der Saccharase der Hefe in die Plasmolysesäfte übergeht.

Wir haben zwei Parallelversuche angestellt, indem wir die Plasmolyse teils bei Zimmertemperatur, 15–18°, teils bei 30–35° eintreten ließen. Zur Plasmolyse angewandt: Hefe H etwa 30%ig + doppelte Menge Glycerin.

Zu allen Inversionsversuchen 1 ccm Saft + 4 ccm Wasser auf 60 ccm 8%ige Rohrzuckerlösung.

A. Plasmolysetemperatur 15–18°:

$$k \cdot 10^4 = 3,53 \text{ (Beil. 31)}$$

$$\text{Aktivität } k/\% = 2,1.$$

B. Plasmolysetemperatur 30–35°:

$$k \cdot 10^4 = 37,4 \text{ (Beil. 32)}$$

$$\text{Aktivität } k/\% = 22,4.$$

Auch im breiigen Bodensatz der bei 30–35° plasmolysierten Hefe wurde die Aktivität bestimmt. Wegen der Ausführung vergl. S. 278.

1,47 g Hefebrei auf 60 ccm Versuchslösung mit 8% Rohrzucker.

$$k \cdot 10^4 = 46 \text{ (Beil. 33)}$$

$$\text{g Präparat auf 100 ccm (\%)} = \frac{1,47 \cdot 100}{60} = 2,45$$

$$\text{Aktivität } (k/\%) = 18,8.$$

Hier ist also wie bei der Autolyse die Aktivität der Rückstände von derselben Größenordnung wie die des Saftes, und zwar 16% kleiner.

C. Neue Saccharasepräparate aus der Hefe H aus Grönwalls Brauerei.

Grönwalls Brauerei arbeitet sowohl obergärig als untergärig. Wir haben zuerst untersucht, welche von den beiden Brauhefetypen, die obergärige oder die untergärige, das günstigste Material zur Saccharasedarstellung sei. Obergärige Preßhefe (Brennereihefe, Backhefe) ist, wie wir mehrmals betont und mit Zahlenangaben bewiesen haben, durchaus ungünstiger als Brauereiunterhefe sowohl mit Hinsicht auf normalen Saccharasegehalt wie auf künstlich gesteigerte Enzymbildung^{1) 2)}.

Bei den beiden Brauereihefen ergaben je 1 ccm breiige Rohhefe mit 60 ccm 8% iger Rohrzuckerlösung bei Zimmertemperatur (18°) und $p_H = 4,3$ (KH_2PO_4) vermischt, die folgenden Inversionskonstanten:

	$k \cdot 10^4$	Zucker b. d. Versuch	Absolute Zellenzahl	$I = \frac{k \times g\text{Zucker}}{\text{Zellenzahl}}$
Bei der Oberhefe	37,5 (Beil. 34)	4,8	$0,24 \cdot 10^{10}$	$7,5 \cdot 10^{-13}$
Beider Unterhefe	59,5 („ 35)	4,8	$0,22 \cdot 10^{10}$	$13,0 \cdot 10^{-13}$

Die Unterhefe ergab also auch in diesem Falle das weitestaus günstigste Resultat. Diese Hefe ist mit der bei unseren früheren Saccharaseversuchen verwendeten Unterhefe H der St. Eriksbrauerei identisch und wird in dieser Brauerei in Reinkultur gehalten und propagiert.

Als Ausgangsmaterial wurden, wie im vorigen Versuch, 75 Liter einer Rohhefe, die bereits eine Kellergärung bei 8° durchgemacht hatte, in Angriff genommen. Zur Saccharase-neubildung in der lebenden Hefe wurde sie während 4 Tagen in der Brauerei bei + 28,5° mit Würze (200 Liter ungehopfte Stammwürze) und Rohrzucker (40 kg) vorbehandelt. Wir sind Herrn Disponenten Karl A. Hagen sowie Herrn Braumeister A. Dessle für die Erlaubnis, diese Versuche in der

¹⁾ Euler und Moberg, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 7, Nr. 12 (1918). — Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 201 (1919).

²⁾ Löfgren, Fermentforschung Bd. 3 (1919).

Brauerei auszuführen, und freundliche Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Die Vorbehandlung wurde in einem eichenen, 800 Liter fassenden Gefäße ausgeführt, das zuvor während eines Tages durch Auffüllen von 30° warmem Wasser und Auflegen der Decke vorgewärmt worden war. Am nächsten Morgen wurde das Wasser abgelassen und die 75 Liter Hefe mit 300 Liter 29°igem Wasser aufgeschlemmt. Am ersten Tage der Vorbehandlung wurden die 200 Liter Würze (etwa 8 kg Malzzucker enthaltend), worin außerdem noch 10 kg Rohrzucker aufgelöst worden waren, vergoren. Die Zusätze wurden bis 32° gekühlt und in 5 Portionen mit 2 Stunden Zwischenzeit zugegeben. Bei jeder Zugabe wurde gut gerührt und sodann, um Wärmeverluste zu vermeiden, die Decke aufgelegt — etwas schief, um die bei der lebhaften Schaumgärung gebildeten Kohlen säuremengen austreten zu lassen. Am folgenden Morgen wurden die ausgegorenen Flüssigkeiten größtenteils abgehebert und die Gärung am zweiten bis vierten Tage der Vorbehandlung mit je 500 g neutralem Ammonphosphat und 10 kg Rohrzucker in der Weise fortgesetzt, daß sogleich zu Anfang jeder Gärungsführung die ganze Menge Ammonsalz, die Zuckermengen aber in Portionen von 2 kg zugesetzt wurden. Das vorgewärmte eichene Gefäß hat sich dabei als ein prächtiger Thermostat erwiesen, und es hat genügt, die Zuckertlösungen bei + 32° einzurühren um mit der Gärwärme die Wärmeverluste durch die Eiche zu ersetzen und die Lösung bei + 28,5° ± 0,5° konstant zu erhalten. Die Temperatur des Gär-raumes war 16°.

Nach der viertägigen Vorbehandlung wurde die Flüssigkeit 20 Stunden in Ruhe gelassen, damit sich die Hefe absetze, wonach die Lösung so weit abgehebert wurde, als sich ohne erhebliche Verluste an Hefe machen ließ, und die Hefe in der Brauerei abgepreßt. Dabei wurden 15 kg 30%ige Hefe erhalten.

Die Saccharasebildung in der Hefe während der Vorbehandlung geht aus den folgenden Zahlen hervor:

	k · 10 ⁴	g Zucker	Zellenzahl	Inv. pro Zelle
Anfangshefe . .	—	—	—	etwa 10 · 10 ⁻¹²
Nach 3 Tagen Vorbehandlung	117 (Beil. 36)	4,8	0,204 · 10 ¹⁰	27,5 · 10 ⁻¹²
Nach 4 Tagen Vorbehandlung	149 („ 37)	4,8	0,220 · 10 ¹⁰	32,5 · 10 ⁻¹²
0,2 g abgepreßte Hefe	47 („ 38)	4,8	0,069 · 10 ¹⁰	32,5 · 10 ⁻¹²

Also tritt eine Steigerung auf das 3fache des durchschnittlichen Anfangswertes ein (Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 201 [1919]).

Die Hefe wurde auf 11 Standkolben verteilt, die nach Zugabe von einigen cm^3 Toluol mit Wattestopfen versehen wurden, und bei Zimmertemperatur (18°) autolysiert. Die weitere Bearbeitung geschah nach zwei etwas verschiedenen Verfahren:

I. Herstellung des Präparates 3G.

Etwa die Hälfte der verflüssigten Hefe wurde nach 3wöchentlicher Autolyse durch doppelte Faltenfilter in eine große Anzahl Trichter filtriert, wobei erhalten wurde:

1000 cm^3 14,2% Trockensubstanz.

1 cm^3 gab bei 18° die Inversionskonstante $272 \cdot 10^{-4}$ bei 4,8 g Zucker. (Beil. 39.)

Hieraus ergibt sich die Aktivität:

$$I_f = \frac{k \cdot \text{g Zucker}}{\text{g Präparat}} = 0,92; \quad + 0 \left\{ \begin{array}{l} 4 \text{ g Zucker} \\ 0,05 \text{ g Präparat} \\ + 18^\circ \\ \text{P}_{\text{II}}\text{-Opt.} \end{array} \right\} \quad 50 \text{ Minuten.}$$

390 cm^3 14,6% Trockensubstanz.

1 cm^3 gab bei 17° $k = 229 \cdot 10^{-4}$ (Beil. 40)
(entspr. $264 \cdot 10^{-4}$ bei 18°).

Hieraus ergibt sich:

$$I_f = 0,87 (\pm 0 = 53 \text{ Minuten})$$

1390 cm^3

Die gesammelten Filtrate wurden durch Eingießen in 1500 cm^3 96%igen Alkohol (elektrisches Rührwerk) gefällt und 2300 cm^3 der alkoholischen Lösung abgesaugt. Der saccharasehaltige Rest wurde mit 1200 cm^3 destillierten Wassers extrahiert (20 Stunden, teilweise unter Rührung) und durch 10 Faltenfilter filtriert, wobei hellgelbe Filtrate erhalten wurden, die etwa 90% der Saccharasemenge des rohen Autolysesaftes besaßen. Sie wurden gesammelt und mit der gleichen Menge Alkohol gefällt, wobei ein flockiger, aber schwerer und sich schnell absetzender Niederschlag entstand, der nach fast

vollständiger Dekantation in wenig destilliertem Wasser aufgeschlemmt wurde. Nach Extrahieren wurde erhalten:

190 cm³ Wasserlösung 3 G. 8,4 % Trockensubstanz.

0,5 cm³ gab bei 18,5° die Inversionskonstante $797 \cdot 10^{-4}$ (4,8 g Zucker). (Beil. 41.)

lf = 8,65 ($\pm 0 - 5,35$ Minuten).

II. Herstellung der Präparate 3G α , 1 und 2.

Diese Präparate, deren Aktivität die vorigen noch übertreffen, wurden durch fraktionierte Autolyse der vorbehandelten Hefe dargestellt. Da nämlich die Hefe schon binnen 4 Tagen recht vollständig verflüssigt war — aus der halben Hefeernte wurden 1200 ccm Saft gewonnen, während nach 3 Wochen diese Ausbeute auf nur 1400 ccm gestiegen ist, siehe oben unter I¹⁾ — wurde am vierten und fünften Tage der Autolyse je ein Viertel der Hefe filtriert und untersucht.

Dabei ergaben sich die folgenden Inversionskonstanten:

4,8 g Zucker bei 18°	k · 10 ⁴
1 g vorbehandelte, abgepreßte Hefe	5 · 47 = 235 (Beil. 38, vgl. oben)
1 cm ³ Saft, 4tägige Autolyse	37 („ 42)
1 cm ³ Saft, 5tägige Autolyse	51 („ 43)
1 g breiige Hefenrückstände, 5tägige Autolyse	$\frac{276}{1,1} = 250$ („ 44)
1 cm ³ Saft, 3wöchentliche Autolyse	264 („ 40, vgl. oben)

Die Saccharase scheint also nicht unmittelbar in Lösung zu gehen, d. h. die recht gleichmäßige Verteilung des Enzyms zwischen Hefebrei und Autolysesaft, welche wir früher festgestellt haben, scheint erst bei der fortschreitenden Autolyse nach der Verflüssigung — in diesem Fall nach etwa 4 Tagen — schnell einzusetzen. Dies gibt ein Mittel an die Hand, eine ganze erste Fraktion von Extraktivstoffen ohne erhebliche Enzymverluste abzutrennen.

¹⁾ Autolyse bei Zimmertemperatur, wie oben angegeben wurde. Die überaus schnelle Verflüssigung der Hefe erscheint weniger auffallend, wenn man bedenkt, daß sie eine 4tägige Vorbehandlung bei 28—29° durchgemacht hatte und deshalb besonders abgeschwächt und gärungsmüde war.

Die breiigen Heferückstände der beiden Filtrierungen wurden gesammelt und mit destilliertem Wasser verrührt, was notwendig war, um ein vollständiges Eintrocknen zu vermeiden. Die Autolyse wurde unter Zusatz von Toluol während 3 Wochen bei Zimmertemperatur fortgesetzt. Jetzt wurde filtriert, wobei erhalten wurde:

650 cm³; 13,4% Trockensubstanz

1 cm³ gab bei 18° Inversionskonstante $301 \cdot 10^{-4}$ bei 4,8 g Zucker (Beil. 45).

Hieraus berechnet sich:

If = 1,08 $\pm 0 = 43$ Minuten

1100 cm³; 7,5% Trockensubstanz

1 cm³ gab bei 18° k = $170 \cdot 10^{-4}$ (Beil. 46)

If = 1,09 ($\pm 0 = 42$ Minuten)

1750 cm³

Die Filtrate wurden wie im vorigen Falle gesammelt und mit 2 Liter Alkohol gefällt, der Niederschlag von der Lösung getrennt und mit destilliertem Wasser extrahiert und filtriert, wobei eine Lösung erhalten wurde von 99% der ursprünglichen Aktivität, also fast quantitativer Ausbeute.

Beim Umfällen der so erhaltenen Lösung mit Alkohol fiel zuerst ein schleimiger, recht kleiner Niederschlag, der für sich in destilliertem Wasser gelöst wurde (Wasserlösung 3 Gα 1, 33,5% der Saccharase des Autolysesaftes enthaltend). Der trüben alkoholischen Mutterlauge wurden noch 1,5 Liter Alkohol zugesetzt, wobei sich eine zweite „Saccharase-Fraktion“ ausschied, die ebenso durch Dekantation abgetrennt wurde und mit destilliertem Wasser aufgenommen die Wasserlösung 3 Gα 2, enthaltend 30% der Saccharase des Rohsaftes, ergab:

109 cm³ Wasserlösung 3 Gα 1. 4,4% Trockensubstanz

0,5 cm³ gab bei 18°: k = $589 \cdot 10^{-4}$ (Beil. 47)

If = 12,82

$\pm 0 = 3,6$ Minuten

135 cm³ Wasserlösung 3 Gα 2. 3,6% Trockensubstanz

0,5 cm³ gab bei 18°: k = $423 \cdot 10^{-4}$ (Beil. 48)

If = 11,3

$\pm 0 = 4,1$ Minuten.

Aus den Wasserlösungen 3 G wurde mittels Überschuß von Alkohol ausgefällt:

Trockenpräparat G (mit 3,3% Aschengehalt)
 0,0235 g Präparat auf 60 ccm mit 4,8 g Rohrzucker
 $k \cdot 10^4 = 430$ (Beil. 50)
 $l_f = 8,8$
 $t = 0^\circ = 5,3$ Minuten.

Berechnung der Ausbeute.

			k, bezogen auf die ganze Pröp- Menge	Trocken- substanz g	
Vorbehandelte Hefe	15 kg	0,2 g gab ¹⁾	$k = 47 \cdot 10^{-4}$	352	5000
Autolysesäfte					
1000 cm ³	1 cm ³	,	$272 \cdot 10^{-4}$	27,2	142 } 199
390 cm ³	1 cm ³	,	$264 \cdot 10^{-4}$	10,3	
650 cm ³	1 cm ³	,	$301 \cdot 10^{-4}$	19,5	87 } 170
1100 cm ³	1 cm ³	,	$170 \cdot 10^{-4}$	18,7	
			<hr/>	<hr/>	
				75,7 = 21,5% des	369 g
				Saccharase-	
				gehalts der	
				Hefe	
Wasserlösungen:					
190 cm ³ 3 G	0,5 cm ³	gab ¹⁾	$797 \cdot 10^{-4}$	30,3	15,9
Nach 2 Alkoholfällungen:					
109 cm ³ 3 G α 1	0,5 cm ³	,	$589 \cdot 10^{-4}$	12,8	4,8
135 cm ³ 3 G α 2	0,5 cm ³	,	$423 \cdot 10^{-4}$	11,4	
			<hr/>	<hr/>	
				54,5 = 72% des	25,6 g
				Saccharase-	
				gehalts der	
				Autolyse-	
				säfte, 15,5% ^o	
				der Hefe.	

Versuche zur Kaolinadsorption.

Die Wasserlösungen 3 G waren noch nicht völlig eiweißfrei und gaben beim Erhitzen milchige Trübungen. In je 20 ccm der Lösungen 3 G, 3 G α 1 und 2 wurden 10—12 g feuchten Kaolinbreies aufgeschlemmt und nach 20 Stunden abgesaugt. Die Resultate waren die folgenden:

24 ccm 3 G mit 5,8% = 1,39 g Trockensubstanz = 83% vom ursprünglichen. Noch ganz kleine Trübungen bei den Trockengewichtsbestimmungen.

¹⁾ Bei 4,8 g Zucker.

24 ccm 3 G α 1 mit 2,9% = 0,695 g Trockensubstanz = 79% der ursprünglichen. Kleine Trübung bei Erhitzen. 0,5 cm³ gab $k = 398 \cdot 10^{-4}$ (Beil. 49) entspr. $l_f = 13,15$ (18°, 7; 4,8 g Zucker). $\pm 0^\circ = 3,51$ Minuten.

Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl auf je 10 ccm = 0,29 g Substanz.

1. Entsprach 3,35 cm³ 0,169-n Baryt: 2,74% Stickstoff.

2. Entsprach 3,30 cm³ 0,169-n Baryt: 2,69% Stickstoff.

23 ccm 3 G α 2 mit 2,5% = 0,575 g Trockensubstanz = 80% von der ursprünglichen. Keine Trübung.

Dialyseversuche.

Wegen der Mißerfolge bei den Adsorptionsversuchen war anzunehmen, daß die stickstoffhaltigen Bestandteile unseres Präparates nicht eiweißartiger, sondern vielmehr Pepton- oder aminosäureartiger Natur seien. In letzterem Falle müßte eine Dialyse die Aktivität der Präparate erheblich steigern. Es wurden 10 Röhrenfilter aus besonders dünnwandigen Kollodiumhäutchen hergestellt. Dialyse 25 Stunden in fließendem Wasser:

10 ccm 3 G. Volumenvergrößerung auf 36 ccm, 0,70 g Trockensubstanz enthaltend, also 17% wegdiffundiert. 1 ccm gab $k = 380 \cdot 10^{-4}$ bei 4,8 g Zucker. $l_f = 9,92$. $\pm 0^\circ = 4,65$ Minuten.

10 ccm 3 G α 1, Volumenvergrößerung auf 30 ccm	} Trockengewicht 0,41 bzw. 0,31 g, also nur 7—11% von der Trockensubstanz durch Diffusion entfernt.
10 ccm 3 G α 2, Volumenvergrößerung auf 27 ccm	

Hemmung der Saccharasewirkung durch HgCl₂.

Saccharase ist den Angaben der Literatur zufolge im allgemeinen ziemlich unempfindlich gegen Gifte, indessen liegen hierüber nur wenig wirklich zuverlässige Angaben vor.

Es schien uns wünschenswert, besonders bei einem Schwermetallsalz die Hemmung der Enzymwirkung per Gewichtseinheit Gift genau festzustellen, und wir haben zunächst in dieser Hinsicht Quecksilberchlorid untersucht.

Nach Duclaux¹⁾, dessen Angaben in die meisten Handbücher und Lehrbücher der Enzymologie übergegangen sind, soll Sublimat nur wenig auf Saccharase einwirken²⁾. Diese

¹⁾ Duclaux, Ann. Inst. Pasteur Bd. 11, S. 348 (1897).

²⁾ Bau (Wochenschr. f. Brauerei Bd. 20, S. 562 [1903]) gibt an: Durch 0,1% HgCl₂ ist eine Schwächung der Saccharase nachzuweisen.

Angabe war nicht zu vereinbaren mit einer von Euler und Kullberg¹⁾ gemachten Erfahrung. Bei Diffusionsversuchen zeigte sich nämlich, daß Saccharaselösungen schon bei der Berührung mit metallischem Quecksilber auf weniger als die Hälfte ihrer ursprünglichen Aktivität vermindert wurden.

In Übereinstimmung hiermit zeigten denn auch unsere neuen Versuche, daß die Angaben von Duclaux über die Einwirkung des Sublimats auf Saccharase nicht zutreffen, daß vielmehr Sublimat eine außerordentlich starke Giftwirkung auf Saccharase ausübt.

Versuch mit Präparat 3 G.

4,8 g Zucker
 10 ccm 4% KH_2PO_4 -Lösung
 49,5 ccm Wasser
 Gift

Zuletzt Zusatz von 0,5 ccm Wasserlösung 3 G; das Enzym kam also gleichzeitig mit dem Zucker und dem Gift in Berührung, woraus sich die „allmähliche Vergiftungserscheinung“, an den mit der Zeit fallenden Inversionskonstanten hervortretend, erklärt. Ohne Gift ist k eine wirkliche Konstante erster Ordnung.

Inversion bei $+18,1^\circ$ — $18,3^\circ$, Aufheben der Multirotation durch 50% n. Soda.

HgCl ₂ , g:	0,032	0,012 ¹⁾	0,0035	0,00054	0,00027	0,00011	Ohne Gift
Min.	Dreh.	Dreh.	Dreh.	Dreh. $k \cdot 10^4$	Dreh. $k \cdot 10^4$	Dreh. $k \cdot 10^4$	Dreh. $k \cdot 10^4$
0	2,63	—	—	2,62	—	2,62	—
5	2,63	—	—	2,28	87	1,89	199
6	—	—	—	—	—	1,33	326
7	2,63	2,58	2,56	2,24	70	1,81	160
18	—	—	—	1,78	65	0,91	158

Trockensubstanz der Enzymlösung in 0,5 ccm: 0,044 g

Übersicht:

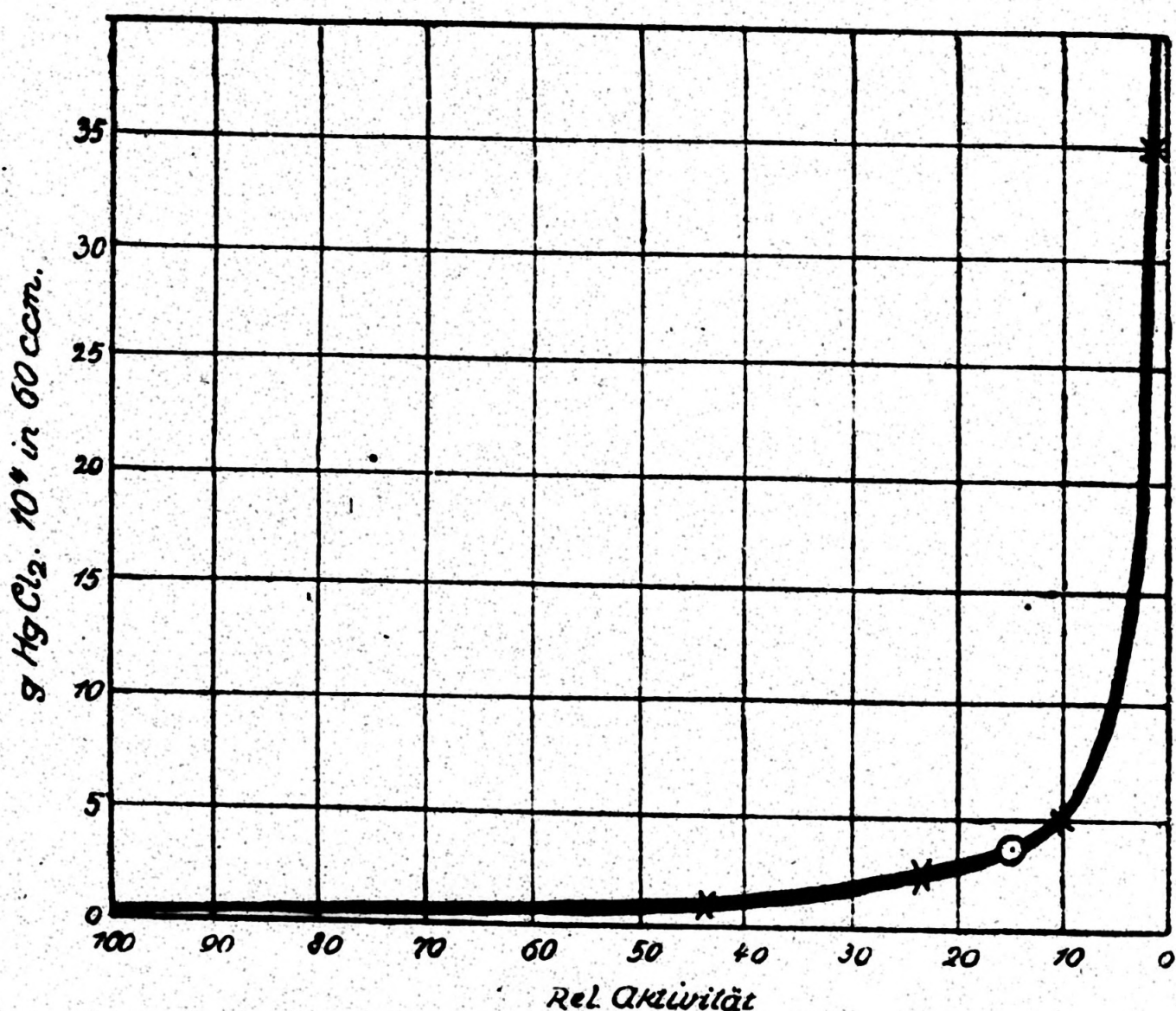
Giftmenge in 60 ccm	in 1 ccm	Aktivität. rel. (7 Minuten)
0	0	100
0,00011	0,0000018	44
0,00027	0,0000045	23
0,00054	0,000009	10

¹⁾ Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 340 (1911).

Giftmenge in 60 ccm	in 1 ccm	Aktivität, rel. (7 Minuten)
0,0035	0,000053	1
0,012	0,00020	0
0,032	0,00053	0

0,044 g des Molgewichts 30000

entsprechen 0,0004 HgCl₂ des Molgewichts 271, wenn auf jedes Saccharasemolekül 1 Molekül HgCl₂ kommt.



Nimmt man für die Saccharase den Messungen von Euler und Kullberg zufolge das Molekulargewicht 30000 an und berechnen wir unter der nicht zutreffenden Voraussetzung, daß das Präparat reine Saccharase ist, die der angewandten Substanzmenge 0,044 g äquimolekulare Menge Sublimat (Mol. Gew. 271), so erhalten wir die Menge 0,0004 g HgCl₂. Wir sehen aus der Lage des Punktes ○ in obiger Kurve, daß etwa bei dieser Sublimatmenge die starke Giftwirkung beginnt. Schlüsse wollen wir aus dieser Rechnung noch nicht ziehen, bis wir ähnliche Bestimmungen mit anderen Giften ausgeführt haben.

V. Zusammenfassung.

a) Zusammenstellung der Resultate mit verschiedenen Ausgangshefen.

Hefe S. B. Unvorbehandelt. Inversionskraft pro Zelle $3-4 \cdot 10^{-12}$

Autolysesaft	If = 0,19 ± 0° = 243 Min. (ber. auf 4 g Zucker ¹⁾)	
N. 2 Alkoholfällungen	1,14	40,5
Dialyserest	1,58	29,2
Trockenpräparat A	1,00	46,2

Hefe H. 1 Tag vorbehandelt. Inversionskraft pro Zelle $19,4 \cdot 10^{-12}$

Autolysesaft	If = 0,55 ± 0° = 84 Min.	
2mal gefällt	3,63	12,7
Trockenpräparat H	3,38	13,7
Kaolinads.-Rest	3,89	11,9

Hefe H. 4 Tage vorbehandelt. Inversionskraft pro Zelle $32,5 \cdot 10^{-12}$

Autolysesaft	If = 0,92 ± 0° = 50 Min.	
	0,87	53
2mal gefällt 3 G	8,65	5,35
Dialyserest	9,92	4,65
Autolysesaft nach frakt. Autolyse	If = 1,08 ± 0° = 43 Min.	
	1,09	42
2mal gefällt 3 G α 1	12,82	3,6
3 G α 2	11,3	4,1
Trockenpräparat G ²⁾	8,8	5,3

b) Eigenschaften unseres aktivsten Saccharasepräparates und Vergleich mit einigen früher erhaltenen Präparaten.

Über Zusammensetzung und Eigenschaften der Saccharase ist bereits viel geschrieben worden³⁾ und man hat aus einem

$$^1) t \text{ Min.} = \frac{46,176}{If}; \text{ denn bei } 18^\circ \text{ ist } L \text{ max} = R \text{ max. } (0,44 - t \cdot 0,005) = 0,36 R \text{ max und } \log(1,36 - 0,36) = 0,5772 \dots \text{ Inversionskonst.}$$

$$= k = \frac{0,5772}{t} \dots If = \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{g \text{ Substanz}} = \frac{0,5772 \cdot 4}{t \cdot 0,05} = \frac{46,176}{t}$$

²⁾ Aus den Lösungen 3 G und 3 G α hergestellt.

³⁾ Literatur über Saccharasepräparate bis 1910: Berthelot, Comptes rendus Bd. 50, S. 980 (1860); Hoppe-Seyler, Chem. Ber. Bd. 4, S. 810 (1871); Gunning, Chem. Ber. Bd. 5, S. 821 (1872); Donath, Chem. Ber. Bd. 8, S. 795 (1875); Barth, Chem. Ber. Bd. 9, S. 474 (1878); O'Sullivan und Tompson, Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 835 (1890); Wroblewski, Chem. Ber. Bd. 31, S. 1135 (1898); Osborne, Diese Zeitschr. Bd. 28, S. 399 (1899); Kölle, Diese Zeitschr. Bd. 29, S. 429 (1900); Wroblewski, Journ. f. prakt. Chem. Bd. 114, S. 1 (1901);

stark divergierenden experimentellen Material mit größerem oder geringerem Anspruch auf Zuverlässigkeit die verschiedensten Schlüsse gezogen.

Bevor wir unsere schließliche Zusammenfassung geben, dürfte es, auch in Rücksicht auf die übrige enzymatische Literatur angebracht sein, folgendes festzustellen:

Da wir bis jetzt ein Enzym nur aus seinen katalytischen Wirkungen beurteilen können, so ist die wesentlichste Eigenschaft eines Enzympräparates seine Aktivität, also seine Wirksamkeit per Gewichtseinheit. Diese Aktivität muß so exakt als möglich ausgedrückt werden, so daß die Messungen leicht wiederholt und dadurch die Aktivitätswerte der Präparate mit denjenigen anderer Präparate verglichen werden können.

In welcher Weise dies bei verschiedenen Enzymen geschehen muß, darüber lassen sich keine allgemeinen Angaben machen, da die Enzyme hinsichtlich ihrer Zeit- bzw. Konzentrationsgesetze vielfach voneinander abweichen.

Was die Aktivität der Saccharase betrifft, so sind geeignete Meßmethoden und Einheiten im Teil III dieser Mitteilung angegeben worden.

Ungeeignet ist es, wie aus den Grundlagen der chemischen Dynamik leicht entwickelt werden kann, wenn zur Feststellung der Aktivität nur die Zeit angegeben wird, in welcher eine gewisse Rohrzuckermenge von einer gewissen Menge Enzympräparat vollständig gespalten wird.

Unzweckmäßig und ungenau müssen auf Grund physikalisch-chemischer Gesichtspunkte ferner Angaben von folgender Form betrachtet werden: „Ein Enzympräparat (bzw. die organische feste Substanz eines Extraktes) bildet in 1 Stunde das x -fache seines Gewichtes an Invertzucker.“

Noch weniger Anhaltspunkte bietet folgende Angabe: „Ich löste 0,01 g Präparat in 5 ccm Wasser und brachte 1 Tropfen von dieser Lösung zu 10 ccm einer 1%igen Rohrzuckerlösung. Nachdem ich die Mischung etwa $\frac{1}{2}$ Stunde lang bei 30° sich selbst überlassen, prüfte ich sie mit Fehlingscher Flüssigkeit und fand sofort eine reichliche Ausscheidung von Kupferoxydul.“ (Diese Zeitschr. Bd 29, S. 432 (1900).

Bei zahlreichen, ausführlich beschriebenen Reinigungsverfahren ist Issajew, Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Bd. 23, S. 796 (1900); Salkowski, Diese Zeitschr. Bd. 31, S. 305 (1901); Oshima, Diese Zeitschr. Bd. 36, S. 42 (1902); Hafner, Diese Zeitschr. Bd. 42, S. 1 (1904); Tribot, Comptes rendus Bd. 147, S. 706 (1908); Salkowski, Diese Zeitschr. Bd. 61, S. 124 (1909); Masuda, Diese Zeitschr. Bd. 66, S. 143 (1910).

die Aktivität des Ausgangsmaterials und des Reinigungsproduktes überhaupt nicht erwähnt, oder es werden Angaben gemacht wie z. B.: „das Präparat war wirksam“ oder „das Präparat hat Schaden gelitten“. Diese Zeitschr. Bd. 36, S. 48 (1902).

Erst wenn wir von einem Enzympräparat wissen, welche Aktivität es unter genau bestimmten äußeren Umständen zeigt, haben wir zum Vergleich mit anderen Präparaten einen Ausgangspunkt, und können über ein so definiertes Präparat Angaben hinsichtlich anderer Eigenschaften, wie Zusammensetzung, Farbreaktionen usw. machen, aus welchen tatsächlich Schlüsse gezogen werden können.

Werden Angaben über Färbungs- und Fällungsreaktionen gemacht, so muß natürlich der Gehalt der untersuchten Lösung an Enzympräparat angegeben werden, da ja sonst aus dem Eintreten oder Ausbleiben einer Reaktion (Biuret-Reaktion oder dergl.) keine Schlüsse gezogen werden können.

Es geschieht im Interesse der Literatur dieses Gebietes, wenn wir also nochmals betonen: Angaben über Zusammensetzung von Enzympräparaten ohne Feststellung ihrer Aktivität und der Konzentration der untersuchten Lösungen sind für die wissenschaftliche oder praktische Beurteilung von Enzympräparaten ohne Wert.

Was Präzision und Zweckmäßigkeit der Angaben betrifft, so muß neben den neueren Arbeiten von Mathews und Glenn¹⁾ und von Meisenheimer, Gambarjan und Semper²⁾ ganz besonders die Arbeit von O'Sullivan und Tompson³⁾ hervorgehoben werden. Auch hinsichtlich der Aktivität der Präparate sind O'Sullivan und Tompson anderen Forschern, welche nach ihnen Saccharasepräparate hergestellt haben, weit voraus, sofern sich darüber überhaupt Anhaltspunkte gewinnen lassen.

Wir stellen im folgenden unsere besten Präparate mit denjenigen von O'Sullivan und Tompson, Mathews und

¹⁾ Mathews und Glenn, Journ. Biol. Chem. Bd. 9, S. 29 (1911).

²⁾ Meisenheimer, Gambarjan und Semper, Biochem. Zeitschr. Bd. 54, S. 108 (1913).

³⁾ O'Sullivan und Tompson, Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834 (1890).

Glenn, Meisenheimer und Mitarb., Euler, Lindberg und Melander sowie Euler und Kullberg zusammen:

Autor	Aktivität ± 0° = x Min. (18—20°)	Stickstoffgehalt %
O'Sullivan und Tompson, l. c. S. 897	25 Min.	3,68
Mathews und Glenn, l. c.	35—50 Min.	1,20—1,30
Meisenheimer und Mitarb., l. c. Euler, Lindberg und Melander, Diese Zeitschr. Bd. 69, S. 152 (1910)	10—20 Min. (?)	
Euler und Kullberg, l. c.	14 Min.	0,36
Euler und Svanberg	10 Min.	1,85
Euler und Svanberg	5,3 Min.	
Euler und Svanberg	3,5 Min.	Nach Kaolin- adsorption 2,72

Unser Präparat 3 G hatte einen Aschengehalt von 3,3%.

Hinsichtlich der Aktivität des erhaltenen Präparates ist also durch die vorliegende Arbeit ein weiterer, wesentlicher Fortschritt erzielt worden. Wir wollen aber hierzu gleich bemerken, daß nach unserer Ansicht unser Präparat noch weit vom Zustand der Reinheit entfernt ist, und daß wir deswegen Hypothesen über die Zusammensetzung der Saccharase noch verfrüht halten.

Dagegen wollen wir nicht unterlassen, folgende Überschlagsrechnung mitzuteilen, durch welche auch ein Anhaltspunkt über die Wirksamkeit der eingeschlagenen Methodik gewonnen wird.

$$\text{Inversionsvermögen der Hefe } H: \frac{k \times \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}} = 10 \cdot 10^{-12}$$

$$\text{Inversionsfähigkeit des Präparates 3 G} = 8,8$$

Eine Hefezelle H ist demnach im Mittel so aktiv wie $1,2 \cdot 10^{-12}$ g Präparat 3 G.

Das mittlere Trockengewicht für 1 Zelle ist $62,5 \cdot 10^{-12}$ g. Hiernach würde das Präparat etwa $\frac{1}{50}$ der gesamten Zelltrockensubstanz ausmachen¹⁾, oder mit anderen Worten, wenn

¹⁾ Obiger auf rein experimentellen Daten fußender Vergleich unseres

wir annehmen dürften, daß unser Präparat rein ist, würde das Saccharase-Molekül resp. die Saccharasegruppe etwa $\frac{1}{50}$ der gesamten Zelltrockensubstanz betragen. Führen wir für unser bestes in Lösung erhaltenes Präparat eine entsprechende Rechnung aus, so würden wir etwa $\frac{1}{100}$ der gesamten Zelltrockensubstanz als Saccharasegruppe anzunehmen haben. Vermutlich macht ja die Saccharasegruppe des Protoplasmas einen erheblich kleineren Anteil der Zellsubstanz aus, aber es mag doch bemerkt werden, daß die Aktivitätszahlen, zu welchen unsere neuen Versuche geführt haben und welche wir zu dieser Rechnung benutzten, keine unmöglichen Konsequenzen mehr ergeben.

Was die Ausbeute an wirksamem Präparat betrifft, so könnten wir nach obiger Rechnung als im Maximum etwa $\frac{1}{100}$ der Zelltrockensubstanz bzw. $\frac{1}{300}$ der frischen Hefe erwarten, wenn wir den Zellen alle Saccharase entziehen können. Da aber etwa zwei Drittel in den breiigen Rückständen bleibt, so ergibt sich als maximale Ausbeute etwa $\frac{1}{900}$ des angewandten Gewichtes an frischer Hefe.

Präparates mit frischer Hefe ist offenbar ganz frei von hypothetischen Annahmen.

Wenn wir an dieselbe noch folgende kleine Rechnung anschließen, so geschieht dies mit dem ausdrücklichen Bemerkem, daß dieselbe nichts anderes zeigen soll, als Folgerungen, zu welchen man mit der einen oder anderen hypothetischen Voraussetzung kommt.

Für das Molekulargewicht der Saccharase wurde von Euler und Kullberg ein Wert von rund 30000 gefunden. Wir wollen den Wert 50000 annehmen, der sich nach der Formel von Einstein ergibt.

Wenn 1 g-Molekül $6,3 \cdot 10^{23}$ Moleküle enthält, so wiegt 1 Molekül Saccharase

$$\frac{50000}{6,3 \cdot 10^{23}} = 0,8 \cdot 10^{-19} \text{ g.}$$

Wäre unser Präparat 3 G rein, so würde 1 Hefezelle

$1,2 \cdot 10^{-12}$ g Saccharase enthalten = $0,2 \cdot 10^{-16}$ g-Mol. Saccharase
= $1,2 \cdot 10^7$ Saccharase-Moleküle.

(Umgekehrt, wenn wir annehmen würden, daß in einer Hefezelle 1 Saccharasemolekül oder Saccharaserest die Inversion katalysiert — man muß wohl annehmen, daß jede Zelle wenigstens 1 Saccharasemolekül als Träger einer wesentlichen Eigenschaft enthält —, so würde unser Präparat nur etwa den 10^7 . Teil an reiner Saccharase enthalten. Letztere Annahme führt also zu unannehmbaren Konsequenzen.)

Beilagen.

Nr. der Bei- lage	Minuten	Drehung	k · 10 ⁴	Bemerkungen
A. Versuche mit Brennerei-Oberhefe S B.				
10 cm-Rohr				
1	0	2,59		
	15	2,31	23	0,28 g frische Hefe
	30	2,10	22	
	45	1,97	19	Mittel 21
2	0	2,60		
	10	2,23	48	1 cm ³ Saft der Autolyse bei 35°
	20	1,93	45	
	30	1,63	47	Mittel 47
3	0	2,60		
	20	1,72	62	1 cm ³ Saft der Autolyse bei 18°
	30	1,38	62	Mittel 62
4	0	2,60		
	15	2,45	12,6	0,2 cm ³ Autolysesaft A
	30	2,32	12,0	
	60	2,10	11,1	Mittel 12.5
	180	1,11	13,3	
	300	0,48	13,3	
5	0	2,61		
	60	2,46	3,15	0,05 cm ³ Autolysesaft A
	240	2,08	2,94	
	300	1,94	3,04	Mittel 3,04
6	0	2,60		
	15	1,89	65	1 cm ³ Autolysesaft A
	30	1,22	72	
	45	0,71	74	Mittel 70
7	0	2,58		
	15	2,24	30	0,5 cm ³ Autolysesaft A
	30	1,81	36	
	60	1,15	38	Mittel 35
8	0	2,58		
	5	2,10	128	2 cm ³ Autolysesaft A
	10	1,73	121	
	15	1,31	130	
	20	0,95	136	Mittel 129

Nr. der Be- lege	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Bemerkungen
		mg Invertzucker in 2 cm ³ Lösung ¹⁾		
9	0	0,		
	10	15,3	43,6	0,86 g breiige Rückstände
	15	23,3	45,6	
	20	30,0	45,1	Mittel 44,8
	∞	160		
		10 cm-Rohr		
10	0	2,62		
	15	1,62	96	1 cm ³ Autolysesaft B I
	30	0,88	98	
	46	0,25	104	Mittel 99
11	0	2,60		
	15	1,78	77	1 cm ³ Autolysesaft B II
	30	1,20	73	
	45	0,64	78	Mittel 76
12	0	1,30 (5 cm- Rohr)		
	15	1,30	0	10 cm ³ alkoholische Lösung
	63	1,31	0	keine Inversion
13	0	1,31		10 cm ³ alkoholische Lösung
	15	1,32	0	
	60	1,32	0	keine Inversion
14	0	2,60		
	10	1,40	181	2 cm ³ Wasserlösung I
	20	0,59	184	Mittel 183
15	0	2,60		
	10	1,31	198	2 cm ³ Wasserlösung II
	20	0,48	200	Mittel 199
16	0	2,60		
	4	2,13	156	0,5 cm ³ Wasserlösung 3
	8	1,73	154	
	12	1,38	154	Mittel 156
	16	1,03	160	
17	0	2,62		
	4	2,11	169	0,5 cm ³ Wasserlösung 3b
	8	1,67	170	
	13	1,17	176	Mittel 172

¹⁾ Wegen der Anfangsreduktion korrigiert.

Nr. der Beilage	Minuten	Drehung	k · 10 ⁴	Bemerkungen
18	0	2,60		
	4	2,06	181	1,5 cm ³ Dialyserückstand
	8	1,62	177	
	12	1,22	180	Mittel 179
19	0	2,60		
	5	1,95	177	0,5 cm ³ Wasserlösung 4
	8	1,65	171	
	12	1,28	170	Mittel 173
20	0	2,62		
	4	2,10	173	0,6 cm ³ nach Farbstoffbehandlung
	8	1,68	168	
	12	1,32	166	Mittel 169
21	0	2,62		
	4	2,12	153	0,078 g Präparat A
	8	1,61	176	
	12	1,29	156	Mittel 162
B. Versuche mit Brauerei-Unterhefe H.				
22	0	1,31 (5 cm-Rohr)		
	9	1,04	80	Vorbehandelte Hefe H
	20	0,76	81	(Hamburger Brauerei)
	30	0,56	80	Mittel 80
23	0	2,60		
	6	1,56	254	1 cm ³ Autolysesaft
	9	1,15	256	
	12	0,84	251	Mittel 256
	18	0,25	265	
24	0	2,64		
	8	1,29	256	0,5 cm ³ Wasserlösung 3H
	10	1,02	261	
	12	0,76	268	Mittel 265
	14	0,53	275	
25	0	2,64		
	8	1,69	167	0,5 cm ³ nach Adsorption mit
	10	1,50	166	Kaolin A
	12	1,26	176	
	14	1,11	172	Mittel 170

Nr. der Beilage	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Bemerkungen
26	0	2,64		0,5 cm ³ nach Adsorption mit Kaolin B Mittel 203
	10	1,29	205	
	12	1,11	201	
	14	0,92	202	
27	0	2,64		1 cm ³ Dialyserückstand Mittel 184
	10	1,43	179	
	12	1,21	184	
	14	1,00	189	
28	0	2,64		1 cm ³ Lös. nach Ads. mit Al(OH) ₃ Mittel 28,6
	10	2,42	27,5	
	12	2,36	29,4	
	14	2,32	29,0	
29	0	2,64		Filtrat von Al(OH) ₃ Mittel 29,5
	8	1,18	285	
	10	0,86	300	
	12	0,63	300	
30	0	2,64		0,022 g Trockenpräparat H Mittel 155
	8	1,75	156	
	10	1,57	155	
	12	1,40	154	
	14	1,24	155	

Versuche mit glyzerinplasmolysierter Unterhefe H.

31	0	2,58		1 cm ³ Saft (15—18°) Mittel 3,53
	60	2,41	3,62	
	300	1,82	3,54	
	511	1,42	3,42	
32	0	2,62		1 cm ³ Saft (30—35°) Mittel 37,4
	10	2,32	38,5	
	51	1,40	36,2	
33		mg Invertzucker in 1 cm ³ Lösung ¹⁾		1,47 g Brei (30—35°) Mittel 46
	0	0		
	5	4,2	47	
	10	7,8	45	
	30	21,4	45	

¹⁾ Mit der Anfangsreduktion korrigiert.

Nr. der Bei- lage		Minuten	Drehung	k · 10 ⁴	Bemerkungen
34	Oberhefe		5 cm-Rohr		
		0	1,33		Mittel 37,5
		30	0,92	37	
		40	0,79	39	
		50	0,69	36	
60	0,59	38			
35	Unterhefe	30	0,75	59	Mittel 59,5
		39	0,60	58	
		49	0,41	61	
36	3 Tage Vorbehandlung	5	1,08	130	Mittel 117
		10	0,89	122	
		15	0,80	101	
		17	0,67	117	
37	4 Tage Vorbehandlung	5	1,06	141	Mittel 149
		10	0,81	148	
		15	0,60	151	
		20	0,41	155	
38	0,2 g abgepreßte Hefe	10	1,12	47	Mittel 47
		15	1,04	46	
		19	0,97	48	
39	Autolysesaft		10 cm-Rohr		
		0	2,65		Mittel 272
		6	1,55	267	
		8	1,25	270	
		10	0,98	274	
12	0,75	275			
40	"	8	1,44	225	Mittel 229
		10	1,19	228	
		12	0,95	234	
41	3 G.	5	0,53	781	Mittel 797
		6	0,26	801	
		7	0,05	808	
42	Autolysesaft	0	2,60		Mittel 37
		5	2,44	40	
		11	2,30	35	
43	"	0	2,60		Mittel 51
		5	2,39	53	
		11	2,18	50	

Nr. der Beilage		Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Bemerkungen
44	1,1 g breiiger Rückstand		5 cm-Rohr		
		0	1,33		Mittel 276
		10	0,49	273	
		12	0,38	272	
45	Autolysesaft		10 cm-Rohr		
		0	2,65		Mittel 301
		8	1,18	288	
		10	0,85	305	
46	"	8	1,69	170	Mittel 170
		10	1,50	169	
		12	1,31	170	
		8	0,24	610	
47	3 G z 1	0	2,65		
		5	0,93	571	Mittel 589
		6	0,67	585	
		8	0,24	610	
48	3 G z 2	5	1,24	436	Mittel 423
		6	1,07	423	
		8	0,76	411	
49	Nach Koalinadsorption	0	2,65		Mittel 393
		5	1,34	397	
		6	1,17	388	
		8	0,76	409	
50	0,0235 g Trockenpr. G	0	1,33		Mittel 430
		8	0,39	401	
		10	0,24	404	
		12	0,10	496	