

Bestimmung der Maltase in der Hefe.

(II. Mitteilung über Maltase.)

Von

Richard Willstätter und Werner Steibelt.

Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften
in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 25. September 1920.)

I. Maltasewirkung frischer Hefe bei Gegenwart von Chloroform (Experiment von Morris).

Entgegen der älteren Anschauung, daß die Maltose von Hefe direkt vergoren werde, zeigten C. J. Lintner¹⁾ und E. Fischer²⁾, daß die Hefe auch diesen Zucker zunächst durch ein Enzym spaltet, indem sie aus getrockneter Hefe wäßrige Auszüge darstellten, welche Maltose in Glukose umwandelten. Die Verschiedenheit des die Maltose spaltenden Enzyms vom Invertin sollte sich daraus ergeben, daß beim Auslaugen frischer Hefe mit Wasser (auch bei Anwendung von Betäubungsmitteln) immer nur das Enzym in Lösung geht, das den Rohrzucker spaltet. Es gelingt aber doch, wie wir vor kurzem mitgeteilt haben³⁾, ebenso wie Saccharase auch Maltase aus frischer Hefe auszuziehen, wenn man durch Neutralisieren der entstehenden Säure die Zerstörung des empfindlichen Enzyms verhütet. Die Maltase ist nach E. Fischer⁴⁾ schon in der normalen Hefe enthalten, sie wird

¹⁾ Zeitschr. f. ges. Brauwesen 1892, S. 106; C. J. Lintner und E. Kröber, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 1050 (1895).

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 27, S. 2985 und S. 3479 (1894).

³⁾ R. Willstätter, Tr. Oppenheimer und W. Steibelt, Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 232 (1920).

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 1429, 1437 (1895); Diese Zeitschr. Bd. 26, 60 und zwar S. 75 (1898).

nicht erst beim Trocknen gebildet. E. Fischer¹⁾ hatte anfangs beobachtet, daß feuchte, unversehrte Hefe imstande sei, bei Gegenwart von Chloroform α -Methylglukosid und Maltose zu spalten. Dagegen hat G. H. Morris²⁾ mitgeteilt, daß durch frische Hefe, sowohl Froberg-Hefe wie auch Brauereihefe, keine Spur Traubenzucker aus Maltose erzeugt werde. E. Fischer³⁾ wiederholte darauf die Versuche bei Gegenwart anästhesierender Mittel und fand bestätigt, daß frische Hefen, Reinkulturen von Froberg- und Saaz-Hefe, in wäßriger, mit Chloroform gesättigter Lösung auf Maltose keine Wirkung ausüben. Bei Anwendung anderer anästhesierender Mittel, wie Toluol und Thymol, gelang es indessen E. Fischer, reichliche Malzzuckerspaltung (in 40 Stunden bei 33°) zu erzielen und dadurch die Annahme zu bestätigen, daß das Enzym schon in der lebenden Hefe existiert. H. v. Euler und S. Kullberg⁴⁾ bestätigten diese Ergebnisse und bemerkten dazu: „Immerhin wird schon durch Zusatz von Toluol die Maltosespaltung der lebenden Hefe sehr stark herabgedrückt.“

Die Differenz zwischen dem Verhalten der Hefe bei Anwesenheit von Chloroform und von Toluol ist unerklärt geblieben. Es erscheint uns aber als eine Vorbedingung, um Methoden für die Bestimmung des Maltasegehaltes von Hefen zu schaffen, daß diese Verhältnisse aufgeklärt werden, von denen E. Fischer⁵⁾ sagt: „In der Tat sind die Erscheinungen sehr verwickelt, wenn die Hefe bei Gegenwart von Chloroform mit der Maltoselösung in Berührung bleibt“.

Nachdem wir erkannt hatten, daß zwischen Saccharase und Maltase in Bezug auf ihre Exosmose aus frischer Hefe in Wasser kein wesentlicher Unterschied besteht, lag es nahe anzunehmen, daß die Verhältnisse bei der Maltosespaltung durch Hefe nur deshalb so kompliziert erscheinen, weil man weder der Empfindlichkeit der Maltase gegen Säuren noch

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 27, S. 3479 (1894).

²⁾ Proc. Chem. Soc. 1895, S. 46.

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 28, S. 1429 (1895).

⁴⁾ Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 85, 92 (1911).

⁵⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 1434 (1895).

der Abhängigkeit ihrer Wirkung von der Reaktion des Mediums genügend Rechnung getragen hat. In beiden Beziehungen lehrten die Untersuchungen von L. Michaelis und P. Rona¹⁾ „Die Wirkungsbedingungen der Maltase aus Bierhefe“ kennen. Und doch ist die Erkenntnis S. P. L. Sörensens²⁾ von der Wichtigkeit des Säuregrades für die enzymatischen Vorgänge nicht in ihrer vollen Tragweite diesem Gebiete zugute gekommen. Unsere Versuche liefern einen kleinen Beitrag zur Arbeit von Sörensen über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei biologischen Prozessen. Dabei handelt es sich nicht um die Einstellung einer günstigen Wasserstoffzahl in der wäßrigen Zuckerlösung; das Störende ist hier die Erzeugung und die Wirkung von Säure in der Hefezelle selbst.

Der Versuch von Morris täuscht. Bei der Abtötung der Hefe durch Chloroform setzt die Produktion von Säure in der Hefezelle ein und schafft in dieser ein für die Spaltung der Maltose ungünstiges Milieu. Der Unterschied zwischen Chloroform und Toluol beruht einfach darauf, daß die Säurebildung der Hefe bei Gegenwart von Toluol eine langsamere ist (siehe Abschnitt III). Wird aber das Experiment mit Chloroform bei Gegenwart geeigneter Puffer ausgeführt, so erfolgt reichliche Maltosespaltung. Der Puffergehalt der Zuckerlösung, den wir für Maltaselösungen am günstigsten gefunden hatten, ergibt in diesem Fall noch keine guten Resultate. Die in der wäßrigen Lösung eingestellte Reaktion erstreckt sich nicht ohne weiteres auf den Ort der Enzymwirkung. Durch reichlicheren Zusatz des Phosphatgemisches und noch weiter durch Anwendung einer etwas stärker alkalischen Phosphatmischung wird der Versuch so verbessert, daß die Hefe bei Gegenwart von Chloroform starke Maltosespaltung bewirkt.

Diese Ergebnisse deuten schon an, daß das Ausbleiben der Maltosespaltung unter den Versuchsbedingungen von

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 (1913); Bd. 58, S. 148 (1913).

²⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 45 (1907); Bd. 21, S. 131 (1909); Bd. 22, S. 352 (1909); Ergebnisse der Physiologie, herausgeg. von Asher und Spiro, Bd. 12, S. 393 (1912).

Morris, Fischer, v. Euler nicht auf Zerstörung der Maltase durch die von der Hefe gebildete Säure beruht, sondern auf zu hohem Säuregrade am Reaktionsorte. Die Maltase ist viel mehr als andere Enzyme auf einen engen Bereich von Wasserstoffionenkonzentrationen angewiesen und dieser wird bei der Säureproduktion der Hefe überschritten, während das optimale $[H^+]$ -Gebiet des Invertins nicht dadurch gestört wird. Als L. Michaelis und P. Rona¹⁾ das Wirkungsoptimum der Maltase bestimmten, fanden sie, daß zu beiden Seiten desselben ein rapider Abfall der Wirkung eintritt.

Bei Gegenwart von 0,5 ccm Chloroform wurde von 2,2 g frischer Löwenbräuhefe in 100 ccm 5%iger Maltosehydratlösung bei 30°, wenn kein Puffer zugegen war, in 400 Min. keine Maltosespaltung bewirkt (beobachtet nach Abstoppen mit $\frac{1}{5}$ Volumen 2n. Sodalösung bei 15° $\alpha_D = 10,78^\circ$; Drehungsabnahme 0,02°).

Als die Flüssigkeit die gewöhnliche Menge Puffer, nämlich 10 ccm eines hälftigen Gemisches 1,20%iger $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ - und 0,90%iger KH_2PO_4 -Lösung enthielt, wurden in 30' 2,0%, in 90' 8,3% Maltose gespalten (beobachtet 10,67° bzw. 10,27°; Drehungsabnahme 0,13° bzw. 0,53°).

Bei Verdoppelung dieser Puffermenge betrug die Spaltung in 30' 3,5% (beobachtet 10,58°; Drehungsabnahme 0,22°);

bei 20facher Puffermenge und Herabsetzung der Chloroformmenge auf ein Fünftel in 60' 7,8% (beobachtet 10,30°; Drehungsabnahme 0,50°). Aber bei Anwendung der 10fachen Menge Puffer und Einstellung des Mischungsverhältnisses der Phosphate auf $p_H = 7,0$ (6 ccm sekundäres und 4 ccm primäres Phosphat) in 30' 14,1%, in 90' 36,0% (beobachtet 9,90° bzw. 8,50°; Drehungsabnahme 0,90° bzw. 2,30°);

bei ebenfalls 10facher Puffermenge und dem Mischungsverhältnis 7:3 entsprechend $p_H = 7,2$ in 30' 23,1%, in 90' 40,6% (beobachtet 9,32° bzw. 8,20°; Drehungsabnahme 1,48° bzw. 2,60°).

II. Maltaselösungen aus frischer und aus getrockneter Hefe.

Daß die Hefe bei Gegenwart von Chloroform die Maltose nicht spaltet, weil in der Zelle zu große Säurekonzentration auftritt, wird vollends dadurch bewiesen, daß es auch ohne Neutralisation gelingt, aus Frischhefe bei Anwesenheit von Chloroform — wie übrigens auch von Toluol — Maltaselösungen herzustellen. Wäre in der Hefe gemäß dem Experiment von

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 (1913).

Morris die Maltase vernichtet, so könnte sie natürlich nicht später im wäßrigen Auszug reichlich gefunden werden.

Die Säure wird aus der Zelle langsam an das umgebende Wasser abgegeben, in das auch Maltase übergeht. Ein solcher Auszug erwies sich zunächst als unwirksam gegen Malzzucker, auch auf Zusatz der üblichen Puffermenge.

Nach 5stündigem Extrahieren von 1 Teil Frischhefe mit $1\frac{1}{2}$ Teilen Wasser bewirkten 10 ccm Extrakt in 50 ccm Versuchsflüssigkeit, enthaltend 2,5 g Maltosehydrat und normale Puffermenge, bei 30° in 30' keine Spaltung (beobachtet $10,80^\circ$, Drehungsabnahme 0°).

Dennoch liegen in solchen Auszügen Maltaselösungen vor, die aber zu sauer sind. Werden sie neutralisiert und dann mit dem Puffer versetzt, so wirken sie auf Maltose.

In demselben Versuch wie oben wurde ein Teil des Extrakts nach dem Filtrieren mit Ammoniak neutralisiert. Dann ergab die Prüfung unter gleichen Umständen wie zuvor eine deutliche Drehungsabnahme (beobachtet $10,73^\circ$, Drehungsabnahme $0,07^\circ$).

In einem andern Versuch wurde nach 24stündigem Ausziehen der Hefe mit Chloroformwasser abfiltriert und mit Ammoniak neutralisiert. Dann ergab die Prüfung mit derselben Extraktmenge bei gleichem Pufferzusatz in 50' eine Spaltung von 37,5% (beobachtet $8,40^\circ$, Abnahme $2,40^\circ$).

Allerdings enthält die Flüssigkeit nur einen Teil derjenigen Ausbeute, die unser Neutralisationsverfahren¹⁾ unter sonst gleichen Umständen liefert.

Hefeauszug von 15 Stunden ohne Neutralisieren; nach dem Filtrieren neutralisiert; 10 ccm (entspr. 75/81 g Trockenhefe) mit der gewöhnlichen Puffermenge versetzt und in 50 ccm unter Versuchsbedingungen wie oben bei 30° geprüft. In 50 Minuten betrug die Spaltung der Maltose 45,3% (beobachtet $7,90^\circ$, Abnahme $2,90^\circ$), woraus sich gemäß unserer empirischen Kurve²⁾ für den Extrakt der Zeitwert 58 Minuten berechnet.

Hefeauszug von 24 Stunden unter Neutralisieren gleichzeitig aus der gleichen Hefe; 10 ccm (entspr. 100/116 g Trockenhefe, ergaben in 20 Minuten 39,8% Maltosespaltung (beobachtet $8,25^\circ$, Abnahme $2,55^\circ$); Zeitwert 29 Minuten.

Der ohne Neutralisieren dargestellte Hefeauszug enthielt also 50% von der Maltase des Neutralextraktes. Und das Verhältnis ist bei den hier gewählten Zeiten das günstigste. Nach weiteren 9 Stunden Extrahieren ohne Neutralisation ergab sich in 40 Minuten nur 37,5% Maltosespaltung (beobachtet $8,40^\circ$, Abnahme $2,40^\circ$), daher Zeitwert 73 Minuten.

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 236 (1920).

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 237 (1920).

Beim Ausziehen getrockneter Hefe mit Wasser ohne Neutralisieren stört die auftretende Säure viel weniger als bei frischer. Denn sie geht rasch in die wäßrige Flüssigkeit über und wird dadurch sehr verdünnt. So erklärt es sich, daß es beim Verarbeiten von Trockenhefe unwichtig ist, den entstehenden Auszug zu neutralisieren oder ihn, wie Croft Hill¹⁾ vorschreibt, mit 0,1 %iger Natronlauge zu bereiten.

Zwei Auszüge wurden aus gleichen Mengen derselben Trockenhefe dargestellt, a) mit Toluolwasser, b) unter Neutralisieren; 10 ccm Extrakt a bewirkten in 30 Minuten 46,5 % Maltosespaltung (beobachtet 7,82°, Abnahme 2,98°), Zeitwert 36 Minuten. 10 ccm Extrakt b, die infolge der Volumvermehrung beim Neutralisieren nur 9,1 ccm des Auszugs a entsprachen, ergaben in 30 Minuten 48,4 % Maltosespaltung (beobachtet 7,70°, Abnahme 3,10°), Zeitwert 30 Minuten.

Vergleicht man die bei der Verarbeitung frischer und trockener Hefe auftretende Säure, so findet man nach der Indikatorenmethode von Sörensen die Wasserstoffzahl nicht erheblich verschieden (beobachtet etwa 6,2) und die Säuremenge zwar bei der Frischhefe größer, aber nicht viel größer als bei Trockenhefe.

88 g frische Hefe erforderten in 24 Stunden zur Neutralisation 27,2 ccm 1%iges Ammoniak, 20 g Trockenhefe (aus 88 g derselben frischen Hefe erhalten) erforderten 21,0 ccm 1%iges Ammoniak.

Da beim Ausziehen trockener Hefe mit Wasser fast ebensoviel Maltase gefunden wird wie nach dem Neutralisationsverfahren, so ist nicht die in der Lösung vorhandene Säure in dem Maße der Maltase schädlich, wie man nach dem Vergleich der wäßrigen Extrakte frischer Hefe mit und ohne Neutralisieren erwarten sollte. Daher ist die Differenz zwischen den bei Gegenwart antiseptischer Mittel erhaltenen Auszügen frischer Hefe mit und ohne Neutralisieren darauf zurückzuführen, daß die in der Zelle auftretende Säure daselbst nicht allein, was im ersten Abschnitt betont wurde, hemmend, sondern außerdem auch zerstörend wirkt. Allerdings muß erwähnt werden, daß die nicht neutralisierten Auszüge aus trockener Hefe viel haltbarer sind als die aus frischer Hefe. Sie sind reicher an Begleitstoffen, die schützend wirken.

¹⁾ Journ. Chem. Soc. Bd. 73, S. 634 (1898).

Das Neutralisationsverfahren zur Gewinnung von Maltase aus Frischhefe wird daher noch verbessert, wenn man durch Verflüssigung der Hefe mittels Chloroform beschleunigte Bildung und Abwanderung der Säure herbeiführt und dann nach Neutralisieren der entstandenen und unter zeitweiligem Neutralisieren der weiter auftretenden Säure die Maltaselösungen fertigstellt. Über die Extrakte, die mit Verflüssigung und Neutralisieren gewonnen werden, soll eine folgende Arbeit genauere Angaben mitteilen.

III. Bestimmung in frischer Hefe.

Die Wirkung der frischen Hefe auf Maltose bei Gegenwart abtötender Mittel gibt noch kein Maß für ihren Maltasegehalt. Fürs erste sind die Maltasezeitwerte, die sich für die Hefe bei verschiedenen Pufferzusätzen und bei einem bestimmten Pufferzusatz für verschiedene Versuchsdauer ergeben, nicht durchweg konstant (s. die Tabelle). Das Optimum wird bei diesen Versuchen mit Chloroform gefunden beim Zehnfachen der in der Zeitdefinition vorgeschlagenen Puffermenge unter Verschiebung des Mischungsverhältnisses der Phosphate auf $p_H = 7,2$. Dafür sind in 50 ccm Versuchsfüssigkeit erforderlich:

420 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (d. i. 7,0 ccm einer 6,0%igen Lösung von $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),

135 mg KH_2PO_4 (d. i. 3,0 ccm einer 4,5%igen Lösung von KH_2PO_4).

Die enzymatische Wirkung der Hefe ist unter diesen Umständen ferner von dem abtötenden Mittel, z. B. Chloroform oder Toluol in merkwürdigem Maße abhängig, wie die in der folgenden Tabelle angeführten Versuche (Nr. 4, 5, 6) zeigen. Für den Vergleich sind von den Versuchen mit Toluol besonders diejenigen heranzuziehen, bei denen der dafür optimale Pufferzusatz, nämlich die Phosphatmischung der Zeitwertdefinition, aber in 10facher Menge, angewandt wurde.

Bei Gegenwart von Toluol sind die Werte der Maltosepaltung im allgemeinen niedriger als mit Chloroform. Es kommt aber vor, daß in kurzer Versuchsdauer der Zeitwert

Maltasewirkung der frischen Hefe mit Chloroform und Toluol unter Anwendung von Puffern.

1,1 g Hefe auf 50 ccm Versuchsflüssigkeit; 5%ige Maltose; 30°.

Nr.	Abtötendes Mittel (0,25 ccm auf 50 ccm Flüssigkeit)	Puffer		Ver- suchs- zeit (Minuten)	Dreh- ungs- abnahme (°)	Maltose- spaltung (%)	Zeitwert (Minuten)
		ccm sekun- däres Phosphat	ccm primäres Phosphat				
1	Chloroform .	7	3	80	1,67	26,1	87
		9	1	80	1,35	21,1	130
2	Chloroform .	6	4	30	0,90	14,1	83
				90	2,30	36,0	48
	Chloroform .	7	3	30	1,48	23,1	42
				90	2,60	40,6	36
3	Chloroform .	7	3	30	1,65	25,7	33
				80	2,50	39,0	36
	Chloroform .	7	3	30	1,50	23,5	39
				80	2,50	39,0	36
	Chloroform .	14	6	30	1,50	23,5	39
				80	2,45	38,3	37
4	Toluol	5	5	80	0,55	8,6	—
	Toluol	6	4	80	0,55	8,6	—
	Chloroform .	7	3	80	1,30	20,3	140
5	Toluol	5	5	60	1,25	19,5	120
	Toluol	7	3	60	0,55	8,6	—
	Chloroform .	7	3	60	1,75	27,4	59
6	Toluol	5	5	30	0,30	4,7	—
				100	0,90	14,0	280
				165	1,25	19,5	320
	Chloroform .	7	3	30	0,10	1,6	—
				100	0,95	14,8	260
				165	1,75	27,3	160

der Hefe bei Anwendung von Toluol günstiger ausfällt als mit Chloroform und daß sich erst bei längerer Versuchszeit das Verhältnis umkehrt. Die Säureabgabe ist bei der Einwirkung von Chloroform auf den Hefepilz eine raschere, und es scheint dann leichter zu sein, mit Pufferzusatz nach einiger Zeit eine geeignete und gleichbleibende Wasserstoffionenkonzentration in der Zelle für die Dauer einzustellen als bei der langsamen Säureproduktion der Hefe bei Gegenwart von Toluol. Hier genügt der zu Anfang günstige Puffer bei längerer Versuchsdauer nicht mehr für die Säure am Reaktionsorte. Wenn man in dem Wasser, worin die Hefe aufgeschlämmt ist, die aus ihr herausdiffundierende Säure mit Ammoniak titriert, so findet man bei der raschen Einwirkung des Chloroforms auf die Hefe in dem umgebenden Wasser frühzeitig einen großen Teil der überhaupt entstehenden Säure; die Endwerte aber sind mit Chloroform und Toluol ähnlich, sogar bei letzterem höher.

Je 55 g frische Hefe wurden mit je 500 ccm Wasser und 8 ccm Chloroform bzw. Toluol angeschüttelt. Nach 30 Minuten wiesen Proben der mit Klärerde filtrierten Lösungen, nach der Indikatorenmethode mittels Methylrot geprüft, den $pH = 6,3$ auf, zwei weitere nach 6 Stunden entnommene Proben ebenfalls übereinstimmend $pH = 6,0$. Zur Neutralisation verbrauchten aber nach 60 Minuten je 80 % der Versuchsflüssigkeit mit Chloroform 5,4 ccm, derjenigen mit Toluol nur 0,5 ccm 1%iges Ammoniak.

In einem andern Versuch (mit je 88 g Hefe und 132 ccm Wasser unter Zusatz von 5 ccm Chloroform bzw. Toluol) waren zur Neutralisation erforderlich bei Chloroform nach 20' bereits 11,2, nach 30' weitere 3,0, nach 45' + 4,2, nach 80' + 1,6, im ganzen 20,0 ccm 1%iges Ammoniak. Weitere Säure wurde nicht mehr gebildet. Bei Toluol wurden nach 50' erst 1,7 ccm, nach 65' weitere 2,1, nach 80' + 1,0 ccm 1%iges Ammoniak verbraucht, der 20ste ccm aber erst am Ende der vierten Stunde. Nach 7 Stunden war die Produktion von Säure nach Verbrauch von 23,8 ccm 1%igem Ammoniak beendet.

Das Ziel dieser Versuche mit frischer Hefe war die quantitative Bestimmung ihrer Maltasewirkung nach dem Vorbild der Saccharasebestimmung von H. von Euler und seinen Schülern¹⁾. Diese Absicht wird mit der bisherigen Versuchs-

¹⁾ H. Euler und S. Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 71, S. 14 und zwar S. 20 (1911) und Bd. 73, S. 85 und zwar S. 93 (1911). — H. Euler und O. Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 105, S. 187 und zwar S. 194 (1919) und Bd. 106, S. 201 und zwar S. 214 (1919).

anordnung, nämlich mit der von Morris und von E. Fischer, nicht erreicht auch bei Anwendung eines Puffers, der viel stärker alkalisch ist als der Wirkungsbereich der Maltase. Die Bedingungen für die enzymatische Reaktion sollten gleichmäßiger sein, das Eindringen des Puffers zur Einstellung des günstigen Milieus am Reaktionsorte verbessert werden. Eine entscheidende Verbesserung besteht darin, daß man zuerst rasche Verflüssigung der Hefe bewirkt, die Säurebildung und Säureabgabe der Hefe also auf einen kurzen Zeitraum zusammendrängt, und dann erst verdünnt, neutralisiert und den Phosphatpuffer hinzufügt. Vom Experiment E. Fischers, das bei Gegenwart von Toluol die Reaktion der frischen Hefe auf Malzzucker erzielte, unterscheidet sich das Verfahren, das zur quantitativen Bestimmung dieser Hefewirkung dient, in 3 Punkten: rasche Verflüssigung der Hefe, Neutralisation der gebildeten Säure, Einstellung der für die Maltase günstigen Wasserstoffzahl im Sinne von Sørensen und Michaelis.

Unter den abtötenden Mitteln ist Toluol wegen seiner zu langsamen Wirkung unanwendbar. Chloroform ist nicht das günstigste, weil das Ergebnis zu stark von seiner Menge abhängt und die optimale Menge sehr niedrig liegt, so daß leicht Differenzen vorkommen können. Am geeignetsten ist Essigester. Auch hier ist ein Einfluß der Menge auf die Maltasewirkung deutlich, aber er ist nicht so groß. Dieser Einfluß der zu großen Menge organischer Lösungsmittel besteht in einer Erschwerung des Stoffaustausches zwischen der wäßrigen Lösung und der Hefezelle, die zwar nicht mehr unversehrt ist, in der aber die Maltase noch verankert ist.

Einfluß der Chloroformmenge.

11 g Hefe wurden durch Verrühren mit 2,5 ccm Chloroform in 10 Minuten verflüssigt; nach der Neutralisation bewirkten 10% davon in 50 ccm 2,5%iger Maltosehydratlösung bei Gegenwart der in der Zeitwertdefinition vorgeschriebenen Puffermenge bei 30° in 120 Min. 41,4% Maltose-spaltung (Drehungsabnahme 2,65°, Zeitwert 47'), jedoch unter sonst gleichen Bedingungen nur 30,5% Spaltung (Drehungsabnahme 1,95°, Zeitwert 92'), wenn während der Maltosespaltung weitere 0,5 ccm Chloroform zugegeben waren.

Je 11 g Hefe wurden a) mit 2,5, b) mit 5,0 und c) ebenfalls mit 5,0 ccm Chloroform verflüssigt. Nach der Neutralisation bewirkten dann je 20% der drei Aufschlämmungen, von denen a) und b) bei Gegenwart der normalen, c) aber bei Gegenwart der fünffachen Puffermenge zur Wirkung gelangten, in 100 ccm Versuchsflüssigkeit

- a) in 40' 23,4%, in 110' 38,2% Maltosespaltung (Drehungsabnahme: 1,50° bzw. 2,45°, Zeitwert 54' bzw. 51'),
- b) in 40' 13,3%, in 110' 23,9% Spaltung (Drehungsabnahme: 0,85° bzw. 1,53°, Zeitwert 115' bzw. 144'),
- c) in 40' 17,2%, in 110' 27,8% Spaltung (Drehungsabnahme: 1,10° bzw. 1,78°, Zeitwert 89' bzw. 102'.

Alle folgenden Versuche sind ausgeführt unter Zusatz der normalen Phosphatmischung in doppelter Menge (d. h. 60 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 45 mg KH_2PO_4 in 50 ccm Versuchsflüssigkeit).

Je 11 g Hefe wurden a) mit 0,5, b) mit 1,0 und c) mit 2,0 ccm Chloroform verflüssigt. Je 10% der neutralisierten Hefeemulsionen bewirkten dann in 50 ccm Flüssigkeit in 50': a) 33,2%, b) 30,9% und c) 21,8% Maltosespaltung (Drehungsabnahme: a) 2,13°, b) 1,98°, c) 1,40°; Zeitwert: a) 32', b) 37', c) 77').

Einfluß der Menge von Essigester.

Nach der Verflüssigung mit 1, 2 und 3 ccm Essigester bewirkten je 10% von je 11 g Hefe in 50 ccm Versuchsflüssigkeit in 40': 27,8%, 26,2% und 25,7% Spaltung (Drehungsabnahme: 1,78°, 1,68°, 1,65°; Zeitwert: 38', 42', 44').

Bei Verwendung von 0,5, 1 und 2 ccm Essigester auf je 11 g Hefe bewirkten gleiche Hefemengen in 60' 20,0%, 32,4% und 31,3% Maltosespaltung (Drehungsabnahme: 1,28°, 2,08° und 2,00°; Zeitwert 111', 40' und 43') und in 95' —, 39,0% und 37,5% Spaltung (Drehungsabnahme: —, 2,50° und 2,40°; Zeitwert: —, 42', 46').

Vergleich der Maltasewirkung mit Chloroform und Essigester.

Zwei Proben von je 11 g der gleichen Hefe wurden mit 0,5 ccm Chloroform bzw. 1 ccm Essigester verflüssigt und neutralisiert. Je 20% dieser Mengen bewirkten in 100 ccm Versuchsflüssigkeit im Chloroformversuch in 61' 34,7%, in 114' 46,8% Spaltung (Drehungsabnahme: 2,22° bzw. 3,00°), woraus sich der Zeitwert zu 35 bzw. 33 berechnet, und im Versuch mit Essigester in 61' 35,9%, in 114' 46,8% Spaltung (Drehungsabnahme 2,30° bzw. 3,00°), Zeitwert aus beiden Beobachtungen 33.

Für zwei Proben einer anderen Hefe, die ebenfalls mit 0,5 ccm Chloroform bzw. 1 ccm Essigester verflüssigt wurden, von denen aber während der Spaltungsreaktion die doppelten Mengen wie bisher, entsprechend 4,4 g Hefe auf 100 ccm Versuchsflüssigkeit, zur Anwendung kamen, betrug die

Maltosespaltung nach 61' im Chloroformversuch 37,3%, im Versuch mit Essigester 36,9% (Drehungsabnahme 2,39° bzw. 2,36°; Zeitwert 60' bzw. 62').

Aus diesen Versuchen ergibt sich für die Maltasebestimmung folgendes Verfahren:

11 g¹⁾ Hefe werden im Becherglas mit 1 ccm Essigester versetzt und mit einem Glasstab 4—6 Minuten lang verrieben, bis die Verflüssigung vollständig geworden, Darauf wird die Hefe mit 20 ccm Wasser durchgerührt und alsbald tropfenweise mit $n/_{10}$ Ammoniak unter stetigem Rühren bis zur neutralen Reaktion versetzt, die man durch Tüpfeln auf hellblaues Lakmuspapier mit Vergleichsproben von destilliertem Wasser feststellt; erforderlich waren 7—9 ccm. Man wartet 10 Minuten und vervollständigt, wenn es nötig ist, die Neutralisation, wozu nochmals bis 1,5 ccm $n/_{10}$ Ammoniak erforderlich sein können. Die Hefesuspension wird nun in einen 50 ccm-Meßkolben übergeführt, der knapp dafür ausreicht. Zum Versuche entnehmen wir nach sorgfältigem Umschütteln mit der Pipette 20 ccm, zweckmäßig nicht mehr, die mit 5,0 g wasserhaltiger Maltose und dem Puffer²⁾ (120 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 90 mg KH_2PO_4) ohne weiteren Zusatz eines antiseptischen Mittels auf 100 ccm gebracht werden. Messungen werden in zwei Intervallen ausgeführt, und zwar so, daß eine der Beobachtungen möglichst in die Nähe von 50% Maltosespaltung führt, z. B. mit 40 und 80 Minuten Versuchszeit.

Beispiel: Hefe der Löwenbrauerei in München, 28. VII. 20. Die Maltosespaltung mit den Proben von $\frac{2}{5}$ aus 11 g ergab bei 30° in 60 Min. 2,73° Drehungsabnahme entsprechend 42,6% Maltosespaltung und dem Minutenwert 43, in 86 Min. 3,20° Drehungsabnahme entsprechend 50,0% Spaltung und dem Minutenwert 43.

Auf Grund dieser Bestimmung in der frischen Hefe wird man die Ausbeute an Maltase bei der Verarbeitung frischer

¹⁾ Diese Menge, die 2,5 g Trockenhefe entspricht, ist so gewählt, daß das Ergebnis durch Division mit 2 auf die in der Zeitwertdefinition vorgeschriebene Menge (1 g) Trockenhefe zurückgeführt wird.

²⁾ Für die Hefe ist die Maltase-Zeitwertdefinition (Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 238) dahin abgeändert, daß die angegebene Puffermenge verdoppelt ist.

und trockener Hefe verfolgen. Die wenigen bisherigen Beobachtungen, die nur die Bedeutung von Beispielen haben, zeigen, daß sich der größte Teil der Maltase aus der frischen Hefe gewinnen läßt. Es kommt auch vor, daß der Extrakt mehr Maltase als die Frischhefe enthält, aber darauf soll erst eingegangen werden, wenn größeres Versuchsmaterial vorliegt.

FrISCHE Hefe der Löwenbrauerei (15. VII.) ergab den Zeitwert 33, der nach dem Neutralisationsverfahren in 24 Stunden gewonnene Auszug den Zeitwert 38' entsprechend 87% Ausbeute.

FrISCHE Hefe der Löwenbrauerei (23. VII.) ergab den Zeitwert 63, der unter Neutralisieren in 24 Stunden bereitete Auszug den Zeitwert 54' entsprechend 117% Ausbeute.

Die Bestimmungsmethode wird ferner anzuwenden sein, um die Hefe der Brennereien und Brauereien hinsichtlich ihrer maltosespaltenden Kraft quantitativ zu prüfen, während man bisher nur ihre rohrzuckerspaltende Wirkung aus zahlreichen Angaben namentlich von Euler und seinen Mitarbeitern kannte. Um die Wirkung der Hefe auf die beiden Biosen zu vergleichen, ist es nötig, das Invertin in diesem besonderen Falle mit einem anderen Maße als dem von C. O'Sullivan und F. W. Tompson¹⁾ und von Euler²⁾ angegebenen zu messen. Anstatt die Saccharase durch die Zeit in Minuten zu definieren, die 0,05 g Präparat brauchen, um bei 15,5° 4 g Rohrzucker in 25 ccm Lösung zu 75,75% zu spalten, bestimmen wir mit der 10fachen Menge von trockener Hefe oder Präparat (0,5 g in 25 ccm) bei 30° mit einer Lösung von nur 1,1875 g Rohrzucker (entsprechend 1,25 g Maltosehydrat) die Zeit in Minuten bis zur Spaltung von 50%. Diese Angabe soll als „Vergleichszeitwert“ für Saccharase bezeichnet werden. Für den Vergleich wirkt also ein und dieselbe Menge Hefe in dem nämlichen Volumen Lösung bei gleicher Temperatur auf gleiche Mengen Malzzucker und Rohrzucker ein, nur mit der Beson-

¹⁾ Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834 und zwar S. 866 (1890).

²⁾ H. v. Euler, E. Lindberg und K. Melander, Diese Zeitschr. Bd. 69, S. 152, 157 (1910); H. v. Euler und S. Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 335 (1911); H. v. Euler und O. Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269 (1919).

derheit, daß für Maltase $p_H = 6,8$, für Saccharase $p_H = 4,3$ eingestellt wird. Einen solchen Vergleich haben H. v. Euler und S. Kullberg¹⁾ in vorläufiger Weise angestellt und die relative Reaktionsgeschwindigkeit in 8%iger Zuckerlösung für Maltase = 1 (bis 2) und für Bierhefeinvertin = 170 angegeben.

Wir fanden mit einer Münchener Brauereihefe, daß für die Spaltung der Maltose 18mal mehr Zeit erforderlich war wie für die des Rohrzuckers. Und in einem unter Neutralisation dargestellten wäßrigen Auszug der frischen Brauereihefe betrug das Verhältnis zwischen Maltose- und Saccharose-spaltung 1 : 30.

Beispiele: 1. Hefe der Löwenbrauerei, 13. VII. a) Maltasebestimmung. Mit 2,2 g Hefe in 100 ccm in 60 Minuten $2,40^\circ$ Drehungsabnahme entsprechend 37,5% Spaltung und dem Zeitwert 29 Minuten.

b) Saccharasebestimmung. Angewandt 0,55 g Hefe mit 4,75 g Rohrzucker unter Zusatz von 2 ccm 20%iger NaH_2PO_4 -Lösung in 100 ccm. Nach 30 Minuten betrug die Drehungsabnahme $3,76^\circ$ entsprechend 54,8% Spaltung. Saccharasevergleichszeitwert 1,62 Minuten.

2. Auszug aus der Hefe der Löwenbrauerei vom 15. VII. nach dem Neutralisationsverfahren. (Volumvermehrung beim Neutralisieren 14,7%.)

a) Maltasebestimmung. Mit 20 ccm Extrakt in 100 ccm wurden in 18 Minuten $2,15^\circ$ Drehungsabnahme entsprechend 33,6% Maltosespaltung gefunden. Zeitwert 39 Minuten.

b) Saccharasebestimmung. Mit 1,25 ccm Extrakt in 100 ccm wurden in 25 Minuten $3,51^\circ$ Drehungsabnahme entsprechend 51,2% Rohrzuckerspaltung gefunden. Saccharasevergleichswert 1,30 Minuten.

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 73; S. 85 und zwar S. 96 (1911).