

**644. Emil Fischer: Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. II.**

[Aus dem I. Berliner Universitäts-Laboratorium.]

(Eingegangen am 31. Dezember.)

Die im letzten Hefte dieser Berichte enthaltene Mittheilung des Hrn. Röhmann <sup>1)</sup> »Zur Kenntniss der Glucase« veranlasst mich, schon heute einige neue Beobachtungen über das Hefenzym zu beschreiben. Im Gegensatz zu allen früheren Angaben hatte ich gefunden, dass der wässrige Auszug der Bierhefe nicht allein den Rohrzucker, sondern auch die Maltose spaltet, dass dagegen das mit Alkohol gefällte käufliche Invertin die letztere nicht mehr verändert <sup>2)</sup>).

Mit Rücksicht auf diese Verschiedenheit der Wirkung habe ich ferner in der gleichen Abhandlung auf die Möglichkeit hingewiesen, dass die Hefe neben dem Invertin ein zweites Enzym enthalte und Versuche darüber in Aussicht gestellt. Das Ergebniss derselben ist folgendes:

Der Auszug von ganz frischer und sehr reiner Froberghefe, welcher mit der 5 fachen Menge Wasser durch 20 stündiges Erwärmen auf 35° hergestellt war, übte auf Maltose oder  $\alpha$ -Methylglucosid, welche sich gegen das Enzym ganz gleich verhalten, während 20 Stunden bei 30° keine wahrnehmbare Wirkung aus. Die Lösung enthielt überhaupt sehr wenig Extractivstoffe, welche durch Alkohol oder durch Kochen fällbar waren. Allerdings war sie noch im Stande, 10 pCt. ihres Gewichts an Rohrzucker in 24 Stunden völlig zu spalten, aber dafür genügen bekanntlich geringe Mengen von Invertin. Ob die Auslaugung des letzteren bei besonders lebenskräftiger Hefe unter den angegebenen Bedingungen gänzlich unterbleibt, wie es O. Sullivan <sup>3)</sup> bei einer englischen Oberhefe bei gewöhnlicher Temperatur beobachtet, habe ich nicht geprüft, weil es mir wesentlich auf die Untersuchung des Maltose spaltenden Enzyms ankam. Der Extractionsversuch wurde jetzt mit derselben Hefe wiederholt, nachdem dieselbe mit Glaspulver sorgfältig verrieben war, um die Zellen zu öffnen. Der wässrige Auszug zerlegte dann auch die Maltose und das  $\alpha$ -Methylglucosid. Aber die Wirkung war noch verhältnissmässig schwach, da bei 20 stündigem Erwärmen mit der 10 fachen Menge der Enzymlösung auf 35° nur 15 pCt. des Glucosids gespalten wurden. Viel kräftiger wirkte die unverletzte Hefe selber, wie folgender Versuch beweist. 2 Th.  $\alpha$ -Methylglucosid wurden mit 20 Th. Wasser, 1 Th. reiner, frischer Froberghefe und 1 Th. Chloroform während 3 Tagen auf 35° erwärmt. Gährung war nicht eingetreten, und aus der Menge

<sup>1)</sup> Diese Berichte 27, 3251.    <sup>2)</sup> Diese Berichte 27, 2988.

<sup>3)</sup> Trans. Chem. Soc. Lond. 1892, 593.

des Traubenzuckers ergab sich, dass 40 pCt. des Glucosids gespalten waren. Aehnlich war das Resultat bei der Maltose. Selbstverständlich habe ich mich überzeugt, dass Glucosid und Maltose unter den gleichen Bedingungen bei Abwesenheit von Hefe nicht verändert werden. Sehr viel leichter als die frische Hefe giebt bekanntlich die trockene ihr Invertin an Wasser ab. Das gilt auch für das Maltose-Enzym. Es genügt, das Material in dünner Schicht bei Zimmertemperatur an der Luft einige Tage liegen zu lassen, bis es sich zerreiben lässt. In diesem Zustande kann es auch lange aufbewahrt werden. Die getrocknete und fein zerriebene Hefe wird mit der 20 fachen Menge Wasser 20 Stunden bei 30—35° digerirt und die Flüssigkeit filtrirt. Man kann sich hierfür eines Pukall'schen Thonfilters bedienen. Mit einer solchen Enzymlösung sind die in der ersten Abhandlung beschriebenen und auch die nachfolgenden Versuche ausgeführt. Die Abscheidung des leicht veränderlichen Maltose-Enzyms aus der Lösung bietet viel grössere Schwierigkeiten, als diejenige des gewöhnlichen Invertins. Versetzt man dieselbe mit dem doppelten Volumen Alkohol, so fällt ein flockiger Niederschlag, welcher rasch filtrirt und auf porösem Thon im Vacuum getrocknet 0,5—1 pCt. der Gesamtflüssigkeit beträgt. Die Lösung dieses Products in 25 Th. Wasser spaltete zwar noch die Maltose und das  $\alpha$ -Methylglucosid, aber die hydrolysirende Kraft war im Vergleich zur ursprünglichen Enzymlösung auf 4 pCt. zurückgegangen. Eine abermalige starke Verminderung derselben trat ein, als die Fällung mit Alkohol in der gleichen Weise wiederholt wurde. So erklärt es sich, dass das käufliche Invertin, welches bekanntlich durch Alkohol gefällt ist, keine wahrnehmbare Wirkung auf Maltose mehr ausübt.

Die vorliegenden Beobachtungen sprechen unzweifelhaft für die Annahme, dass in der Hefe zwei verschiedene Enzyme enthalten sind, was ich schon in der ersten Notiz als Möglichkeit angeführt habe, und was auch Hr. Röhm ann später behauptet hat. Den Hauptbeweis dafür erblicke ich aber abweichend von Röhm ann nicht in den Erscheinungen bei der Fällung durch Alkohol; denn man kann sich auch vorstellen, dass dasselbe Enzym sowohl den Rohrzucker wie die Maltose, vielleicht durch zwei verschiedene Atomgruppen, angreife und bei der Behandlung mit Alkohol die Wirkung auf Maltose verliere. Viel überzeugender ist für mich der Umstand, dass beim Auslaugen der frischen Hefe mit Wasser, wo eine solche eingreifende Veränderung nicht stattfinden kann, nur das Enzym in Lösung geht, welches den Rohrzucker spaltet. Für letzteres wird man zweifellos den alten Namen Invertin beibehalten. Ueber die Eigenschaften des zweiten Enzyms lässt sich nicht viel sagen, da seine Trennung von dem Invertin noch auszumitteln bleibt. Jedenfalls ist die Annahme von Röhm ann, dass dasselbe mit der im Mais

enthaltenen Glucose identisch sei, durchaus verfrüht. Die Angaben von Géduld<sup>1)</sup> über die Isolirung und Reinigung der Glucose durch wiederholtes Fällen mit Alkohol sprechen eher für das Gegentheil. Grösser ist die von Röhmann betonte Aehnlichkeit mit dem Maltose spaltenden Enzym des Bluts; aber auch hier kann von einer Identifizirung noch keine Rede sein. Ich halte es sogar für wahrscheinlich, dass eine grössere Anzahl von Enzymen die Fähigkeit haben, Maltose in Traubenzucker umzuwandeln, ebenso wie es viele diastatische giebt. Will man dieselben unter der Bezeichnung »Glucasische« zusammenfassen, so lässt sich dagegen nichts sagen. Um alle Missverständnisse und Irrthümer zu vermeiden, wird es aber gut sein, jedesmal den Ursprung des Enzyms anzugeben. In dem Sinne werde ich im Folgenden den Ausdruck Hefe-Glucose gebrauchen.

Ausser der Froberghefe habe ich bisher nur noch den Typus Saaz und ferner eine Oberhefe, die sog. Brenneiereife der hiesigen Versuchsbrauerei geprüft. Bezüglich des Maltose-spaltenden Enzyms verhalten sie sich gleich.

#### Enzym der Milchzuckerhefe.

Dass die Kefirkörner an Wasser ein Enzym abgeben, welches den Milchzucker — und wie ich jetzt zufügen kann, auch den Rohrzucker — spaltet, ist in der ersten Abhandlung erwähnt<sup>2)</sup>. Denselben Versuch habe ich inzwischen mit reiner Milchzuckerhefe wiederholt, welche Hr. Dr. Rehlaender in der hiesigen Versuchs- und Lehrbrauerei unter Anleitung von Hrn. Dr. Lindner auf ungehopfter Bierwürze mit Zusatz von Milchzucker in grösserer Menge gezüchtet hatte.

Weder die frische, noch die an der Luft getrocknete Hefe gab an Wasser von 30° im Laufe von 20 Stunden das Milchzucker-Enzym ab; wohl aber fand dies statt, als die lufttrockne Hefe mit Glaspulver sorgfältig verrieben war. Die aus solchem Material ebenso wie bei der Bierhefe bereitete Enzymlösung besass unzweifelhaft die Fähigkeit, Milchzucker in Hexosen zu verwandeln. Aber ihre Wirkung war im Vergleich zu der aus Kefirkörnern hergestellten ziemlich schwach. Ungleich stärker wurde die Hydrolyse des Milchzuckers, als er mit der lufttrocknen Hefe selbst unter Zusatz von Chloroform genau unter denselben Bedingungen, wie sie früher für  $\alpha$ -Methylglucosid und Bierhefe angegeben sind, behandelt wurde. Die gebildeten Hexosen wurden als Osazone isolirt und ihre Menge betrug  $\frac{1}{4}$  des angewandten Milchzuckers. Mit Rücksicht auf die gewöhnliche Ausbeute an Osazon ergibt sich daraus, dass etwa die Hälfte des Milchzuckers gespalten war.

<sup>1)</sup> Koch's Jahresber., Gährungs-Organismen, 1891, 220.

<sup>2)</sup> Diese Berichte 27, 2991.

Damit ist die Streitfrage über die Existenz der sogen. »Lactase« entschieden, und mir scheint nun auch der weitere Schluss erlaubt, dass der Vergäbrung des Milchzuckers ebenso wie beim Rohrzucker und der Maltose, die Hydrolyse vorausgeht. Ueberhaupt dürfte es nach den jetzt vorliegenden Beobachtungen sehr unwahrscheinlich sein, dass irgend ein Polysaccharid direct d. h. ohne vorherige Spaltung in Hexose vergohren werden kann. Allerdings wird diese Spaltung meist in der Hefezelle selbst stattfinden, da die dafür geeigneten Enzyme namentlich von den lebenskräftigen Individuen völlig zurückgehalten werden.

Von diesem Gesichtspunkte aus habe ich nicht daran gezweifelt, dass die von mir benutzte Milchzuckerhefe, welche den Rohrzucker leicht vergohr, auch ein Enzym für die Spaltung des letzteren bereite, was von Schnurman's Stekhoven schon vor einigen Jahren behauptet worden ist. Der directe Versuch hat diese Voraussetzung bestätigt. Die Milchzuckerhefe producirt also auch 2 Enzyme, die Lactase und eine dem Invertin gleiche oder ähnliche Substanz, welch' letztere im Gegensatze zur Lactase durch Wasser aus der unverletzten Hefe ausgelaut wird. Besondere Versuche über die Isolirung derselben habe ich aber wegen Mangel an Hefe nicht ausgeführt.

Viel zugänglicher ist das Milchzucker spaltende Enzym der Kefirkörner. Da seine Identität mit dem Product der reinen Hefe zwar wahrscheinlich, aber doch auch noch nicht sicher bewiesen ist, so will ich es vorläufig als Kefir-Lactase bezeichnen. Von der »Hefen-Glucose« unterscheidet es sich durch die grössere Beständigkeit gegen Alkohol. Es wird dadurch aus der wässrigen Lösung mit anderen Substanzen als flockiger Niederschlag gefällt, welcher sich trocknen lässt und dann noch eine kräftige Wirkung auf Milchzucker ausübt. Ich beabsichtige, dasselbe weiter zu untersuchen.

#### Verhalten neuer Glucoside gegen Enzyme.

Die nachfolgenden Beobachtungen bestätigen meine früheren Angaben über die Abhängigkeit der Enzymwirkung von der Configuration der Glucoside.

Kefir-Lactase und Lactase (d. h. Milchzuckerhefe und Chloroform) spalten weder das Methylgalactosid<sup>1)</sup> noch das  $\beta$ -Methylglucosid und bilden auch aus Amygdalin kein Bittermandelöl. Sie sind mithin von dem Emulsin ganz verschieden.

Bierhefe-Glucose lässt unverändert das Methylmannosid<sup>2)</sup> (aus *d*-Mannose) und das Methylsorbosid, welches ich aus der Sorbose

<sup>1)</sup> Diese Berichte 27, 2480.

<sup>2)</sup> Die Bildung desselben ist früher (diese Berichte, 26, 2401) von mir ganz kurz erwähnt. Krystallisirt hat sie Hr. van Ekenstein erhalten und mir eine Probe zugesandt.

als schön krystallisirenden Stoff gewonnen habe. Anders verhält sich das Derivat der *d*-Fructose, deren Configuration derjenigen des Traubenzuckers so ähnlich ist. Das Methylfructosid, welches ich ganz in derselben Weise wie das Sorbosid darstellte, aber leider bisher nur als Syrup gewann, wird von dem Enzym in reichlicher Menge gespalten, während es von Invertin nicht verändert wird.

Ueber das Verhalten des rohen syrupösen Methyl-*l*-Glucosids (aus *l*-Glucose) ist schon früher berichtet worden. Ich habe jetzt die Substanz krystallisiert erhalten und zwar die  $\alpha$ -Form ganz rein, die  $\beta$ -Verbindung dagegen vermisch mit dem Isomeren.

Sowohl  $\alpha$ - wie  $\beta$ -Methyl-*l*-Glucosid werden von dem Enzym gar nicht angegriffen.

Emulsin lässt unverändert Methyl-*d*-Mannosid, Methylsorbosid,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Methyl-*l*-Glucosid und Methylgalactosid. Dasselbe gilt endlich für die Lactobionsäure<sup>1)</sup> und deren Calciumsalz, obschon man hier wegen der Aehnlichkeit mit dem Milchzucker das Gegentheil hätte erwarten können.

Myrosin spaltet weder  $\alpha$ - noch  $\beta$ -Methyl-*d*-Glucosid.

Auch bei diesen Versuchen bin ich von Hrn. Dr. P. Rehlaender unterstützt worden und für die Gewinnung reiner Hefen musste ich abermals die Hülfe der HH. Prof. M. Delbrück und Dr. P. Lindner in Anspruch nehmen. Ich sage denselben dafür meinen besten Dank.

#### 645. C. Graebe und F. Ullmann: Darstellung von *o*-Aminobenzophenon und Synthese von Acridon.

(Eingegangen am 29. December.)

Das *o*-Aminobenzophenon ist bisher ziemlich schwer zugänglich. Da es als Ausgangsproduct synthetischer Versuche von Wichtigkeit ist, so haben wir eine bequemere Darstellungsweise desselben ausgearbeitet, nach dem man es leicht in grösseren Mengen erhalten kann. Die *o*-Benzoylbenzoëssäure wird zuerst in das Amid und dieses dann durch Natriumhypobromit in Aminobenzophenon verwandelt. Man erhält so aus 50 g Phtalsäureanhydrid ungefähr 40 g *o*-Aminobenzophenon.

König und Nef<sup>2)</sup> hatten schon versucht durch Erhitzen mit Zinkchlorid dem Aminobenzophenon Wasser zu entziehen und so zum Acridin zu gelangen. Wir haben diesen Versuch mit einer Reihe anderer Deshydrationsmittel wiederholt und gleichfalls meist mit negativem Resultat. Doch wurden kleine Mengen Acridin durch Be-

<sup>1)</sup> Diese Berichte 22, 361.

<sup>2)</sup> Diese Berichte 19, 2431.