

Untersucht wurde das Verhalten von Dimethyläthylcarbinol; beim Durchleiten seiner Dämpfe durch ein rothglühendes eisernes Rohr (gegen 660—700°) ergab sich, dass der grösste Theil des Alkohols durch die Röhre unzersetzt hindurchging; in der Röhre waren Spuren von Kohle bemerkbar, die Gasentwicklung war sehr gering. Die Destillation der in der Vorlage condensirten Flüssigkeit ergab eine unbedeutende Menge eines Aethylenkohlenwasserstoffes, die Hauptmasse bestand aber aus unzersetztem tertiärem Alkohol.

Darauf wurde die Röhre beim Durchleiten des Alkohols auf Rothgluth (gegen 750—800°) erhitzt und als Hauptproducte ein Aethylenkohlenwasserstoff, Wasser und Gase erhalten, die theilweise von Brom absorbirt wurden. Ungeachtet der hohen Temperatur, die bei primären und secundären Alkoholen nicht so hoch angewandt wurde, waren in der Röhre nur Spuren von Kohle abgeschieden.

Diese Versuche lassen vermuthen, dass das Molekül tertiärer Alkohole beständiger ist, als dasjenige der primären und secundären Alkohole.

Die Untersuchung pyrogenetischer Reactionen wird auch mit anderen organischen Verbindungen — Kohlenwasserstoffen, ungesättigten Alkoholen, Oxyden der Kohlenwasserstoffe und einigen mehratomigen Alkoholen — fortgeführt werden.

Meinem Assistenten, Hrn. Zyalow, der mir bei dieser Arbeit behülflich war, statue ich an dieser Stelle meinen Dank ab.

St. Petersburg, Chem. Laboratorium der Artillerie-Academie.

92. O. Emmerling: Synthetische Wirkung der Hefenmaltase.

[Aus dem I. Berliner Universitätslaboratorium.]

(Eingegangen am 28. Februar 1901)

Im Jahre 1898 hat Croft Hill¹⁾ unter dem Titel: »Reversible zymohydrolysis« eine interessante Arbeit veröffentlicht, in welcher er behauptet, durch Einwirkung von Maltase auf concentrirte Traubenzuckerlösung Maltose erhalten zu haben.

Diese Mittheilung hat berechtigtes Aufsehen erregt, denn es lag hier der erste Fall vor, in welchem künstlich mit Hülfe eines Enzyms eine Synthese bewerkstelligt worden war, sowie die bemerkenswerthe Thatsache, dass dasselbe Enzym, welches die Maltose in zwei Moleküle Glucose spaltet, unter bestimmten Bedingungen Erstere aus den Spaltungsproducten wieder aufzubauen im Stande ist.

¹⁾ Journ. Chem. Soc. 173, 634 [1894].

Zwar ist es bekannt, dass die Hydrolyse der Maltose in stärkerer Concentration mittels des Enzyms nie eine vollkommene ist, dass in Folge der Anhäufung der Spaltungsproducte eine allmähliche Verzögerung der Reaction und zuletzt ein Stillstand eintritt; ebenso gestattet die Theorie bei derartigen Gleichgewichtszuständen die Annahme einer Umkehrung des chemischen Processes, und deshalb lagen auch die Croft Hill'schen Resultate durchaus im Bereiche der Möglichkeit. Sie sind denn auch meist in die neueren Lehrbücher als Thatsachen übergegangen, und Duclaux widmet ihnen im zweiten Theile seiner Mikrobiologie mehrere Capitel.

Es hat jedoch auch an Zweifeln nicht gefehlt, und bei der Besprechung der Maltase habe ich unter dem Capitel »Enzyme« in Roscoe's neuem Lehrbuch bereits die Vermuthung ausgesprochen, dass das von Hill erhaltene Disaccharid vielleicht gar keine Maltose gewesen sein möge. Ebenso skeptisch spricht sich Oppenheimer¹⁾ über die Croft Hill'schen Befunde aus.

Ich habe daher die Versuche wiederholt. Sie sind bereits im Sommer vorigen Jahres begonnen worden; die Nothwendigkeit einer monatelangen Einwirkung des Enzyms, die vielfach langwierigen Operationen und die zuletzt erforderliche Controllirung meiner eigenen Resultate haben erst jetzt die Arbeit zu Ende kommen lassen.

Das Ergebniss meiner Untersuchung ist folgendes: die Hefenmaltase wirkt in der That condensirend auf Glucose, es entsteht ein Disaccharid, dasselbe ist aber nicht Maltose, sondern die isomere Isomaltose. Ausserdem entstehen erhebliche Mengen dextrinartiger Körper. Die Hefenmaltase ist also im Stande, synthetisch zu wirken; es findet aber keine einfache Umdrehung der Gleichung statt, sondern das Enzym verhält sich genau so wie Säuren, durch welche ja nach E. Fischer's²⁾ Versuchen mit Glucose Isomaltose gebildet wird. Die Entstehung der sogenannten Reversionsdextrine ist besonders von A. Wohl³⁾ eingehend studirt worden. Auf die Bildung letzterer Körper ist wohl hauptsächlich die Zunahme der optischen Drehung bei dem Hill'schen Versuche zurückzuführen, welche dieser Autor hauptsächlich als Beweis für die Maltosebildung ansieht und auf welche er sogar eine quantitative Bestimmung basirt.

Da es sich um eine Controlle handelte, habe ich genau nach Croft Hill's Angaben gearbeitet; nur in einem Punkte glaubte ich abweichen zu müssen, was nämlich die Isolirung des synthetischen Zuckers betrifft. Aus einem Gemisch von sehr viel Glucose und

¹⁾ Oppenheimer, »Die Fermente«, Leipzig 1900, Seite 55.

²⁾ Diese Berichte 23, 8687 [1890]; 28, 3024 [1895].

³⁾ Diese Berichte 23, 2084 [1890].

wenig Maltose resp. Isomaltose, letztere als Osazon zu isoliren, ist sehr schwer; Glucosazon ist zwar sehr viel schwerer löslich in Wasser, man weiss jedoch, wie sehr Verunreinigungen — und diese sind stets vorhanden — die Löslichkeitsverhältnisse verschieben und verändern. Ich habe daher die Eigenschaft gewisser Hefearten benutzt, wohl Glucose, nicht aber Maltose zu vergähren, und habe das Gemisch von Glucose und vermutheter Maltose der Einwirkung derartiger Hefen unterworfen, nachdem ich mich natürlich überzeugt hatte, dass Maltose nicht im geringsten angegriffen wurde; auch nicht, wenn sie mit viel Glucose gemischt war. Die Hefe verdanke ich Hrn. Prof. Lindner hier, dem ich dafür meinen Dank ausspreche. Leider vergährt diese Hefe Traubenzucker langsamer als gewöhnliche Hefen, besonders ist auch die Züchtung grösserer Mengen eine recht mühsame Arbeit.

Experimentelles.

Zur Bereitung der Enzymlösung wurde 1 kg kräftiger Unterhefe aus der hiesigen Versuchs- und Lehr-Brauerei wiederholt mit kaltem Wasser gewaschen, in einem Presstuche möglichst von Wasser befreit, auf poröse Thonteller gestrichen und über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet. Pulvern und weiteres Trocknen bei steigenden Temperaturen bis 100° erfolgte genau nach Hill's Angaben.

Von dem getrockneten feinen Hefepulver wurden 40 g mit 400 ccm Wasser und soviel einer sehr verdünnten Sodalösung versetzt, dass die Reaction genau neutral war. Nach Zusatz von Toluol wurde drei Tage bei gewöhnlicher Temperatur digerirt, durch Filtrirpapier und zuletzt durch Thonfilter in einen sterilen Kolben filtrirt. Das hellgelbe, neutrale Filtrat schied auf Zusatz von Spuren Säure einen flockigen Niederschlag aus, hinterliess beim Trocknen 3.75 pCt. Rückstand und 0.71 pCt. Asche.

1 ccm bewirkte in 20 ccm einer 2-procentigen Maltoselösung bei 30° in 40 Minuten eine Spaltung von ca. 38 pCt. der Letzteren. Die enzymatische Wirkung war also der Croft Hill'schen Lösung noch überlegen, welche in derselben Zeit nur 20 pCt. spaltete.

Bakterien oder Hefen waren in der Lösung nicht enthalten. Zu 200 ccm einer 40-procentigen reinen Glucoselösung wurden 50 ccm obiger Enzymlösung nebst etwas Toluol gefügt. Diese Flüssigkeit polarisirte im Ventzke-Soleil'schen Apparat im 200 mm-Rohr + 84.2°. Sie wurde in 20 Reagensgläser vertheilt, damit bei den öfteren Untersuchungen keine Verunreinigung des Ganzen stattfinden konnte, die Gläser zugeschmolzen und in einem constant bei 30° gehaltenen Raum aufgestellt. Von Zeit zu Zeit wurde Polarisation und Reductionsvermögen gegen Fehling'sche Lösung geprüft. Zu dem

Zweck diene jedesmal der Inhalt eines Reagensglases, welcher, mit 3 Tropfen Essigsäure versetzt, eben aufgekocht und filtrirt wurde.

Erster Versuch.

Polarisation	am 12. Juni 1900	84.2 ⁰
»	» 30. » 1900	88.4 ⁰
»	» 9. Juli 1900	89.5 ⁰
»	» 19. » 1900	90.5 ⁰
»	» 1. August 1900	91.6 ⁰
»	» 15. » 1900	92.1 ⁰

Von da an nahm die Drehung nicht mehr zu.

In demselben Verhältniss verminderte sich das Reductionsvermögen.

50 ccm Fehling'sche Flüssigkeit wurden reducirt:

am 12. Juni 1900	durch	8.6 ccm
» 30. » 1900	»	9.1 »
» 9. Juli 1900	»	10.4 »
» 19. » 1900	»	11.2 »
» 1. August 1900	»	11.4 »
» 15. » 1900	»	12.1 »

Zweiter Versuch.

Polarisation	am 5. November 1900	86.5 ⁰
»	» 6. December 1900	89.7 ⁰
»	» 10. Januar 1901	92.2 ⁰
»	» 20. » 1901	93.6 ⁰

50 ccm Fehling'sche Flüssigkeit wurden reducirt:

am 5. November 1900	durch	7.2 ccm
» 6. December 1900	»	9.1 »
» 10. Januar 1901	»	11.4 »
» 20. » 1901	»	12.4 »

Sämmtliche Lösungen erwiesen sich am Ende des Versuchs bacterienfrei. Es blieben beim ersten Versuch 14 Gläser mit ca. 160 ccm, im zweiten 16 mit ca. 186 ccm Flüssigkeit zur weiteren Verarbeitung.

Es wurde zur Zerstörung des Enzyms und Vertreibung des Toluols aufgekocht, mit Wasser bis zu einem ungefähren Gehalt von 10 pCt. Zucker verdünnt, mit etwas Hefenasche und darauf mit der oben erwähnten Maltase freien Hefe versetzt. Bei 25⁰ trat bald Gährung ein, welche jedoch fast eine Woche andauerte. Wie sich später herausstellte, waren auch nach dieser Zeit noch Spuren Glucose vorhanden. Nach der Vergährung wurde filtrirt und im Vacuum zum Extract verdampft. Auf Zusatz von Alkohol schied sich eine anfangs weiche, später pulvrig werdende Substanz aus, deren Lösung stark rechts drehte; es waren dies Dextrine, welche ja durch die meisten Hefen auch nicht vergohren werden.

Die alkoholische Flüssigkeit wurde wieder verdampft; sie gab ein syrupöses Extract, welches Fehling'sche Lösung reducirte und mit gewöhnlicher Hefe nur noch Spuren von Vergärung in Folge der Anwesenheit sehr kleiner Mengen Glucose zeigte. Dass die Hauptmenge nicht vergohr, bewies schon, dass keine Maltose entstanden sein konnte.

Die nun ganz glucosefreie Flüssigkeit wurde im Vacuum concentrirt und mit reinem Phenylhydrazin, nebst der erforderlichen Menge Essigsäure, versetzt. Nach Zugabe von etwas Kochsalz erhitzte ich eine Stunde auf dem Wasserbade. Es fand dabei keine Ausscheidung von Osazon statt, erst beim Erkalten erfüllte sich die Flüssigkeit mit hellgelben Flocken, welche abfiltrirt, mit wenig kaltem Wasser, dann mit Aether gewaschen wurden. Beim Trocknen bei gewöhnlicher Temperatur färbte die Masse sich dunkel. Durch Lösen in etwas Wasser enthaltendem Essigester und Verdampfen der Lösung gelang es, kleine dunkelgelbe Nadeln zu gewinnen, welche nicht ganz scharf bei 149—152° schmolzen.

Die leichte Löslichkeit in Wasser, der Schmelzpunkt, sowie besonders auch die Unvergärbbarkeit durch Hefe lassen die Substanz als Isomaltose-Osazon erscheinen.

$C_{24}H_{32}N_4O_9$. Ber. C 55.33, H 6.16, N 10.73.

Gef. » 55.16, » 6.28, » 10.51.

Ich glaube bestimmt, dass das Osazon, welches auch Croft Hill dargestellt hat, und dessen Schmelzpunkt er zu 178—180° angiebt, während Maltosazon bei 206° schmilzt, aus einem Gemisch von Glucosazon mit Isomaltosazon bestanden hat. Die Ausbeute an letzterem ist sehr gering. In meinen beiden Versuchen gewann ich im Ganzen 1.2 g Isomaltosazon, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, dass durch die öfteren Vergährungen, Filtrationen u. s. w. Verluste unvermeidlich waren, auch die leichte Löslichkeit des Isomaltosazons mag zu solchen beigetragen haben.

Zuletzt glaubte ich feststellen zu müssen, ob bei den besprochenen Vorgängen überhaupt die Wirkung eines Enzyms und welches Enzyms vorliege. Croft Hill hat bereits mitgetheilt, dass der erhitzte Hefeauszug keine Veränderung der Glucose herbeiführe. Diese Beobachtung ist ganz richtig; es war aber damit nicht bewiesen, dass nun gerade die Maltase der Hefe, welche letztere ja auch noch andere Enzyme enthält, die Synthese vollbracht hatte.

Ich habe daher einen Auszug aus getrockneter, maltasefreier Hefe hergestellt und diesen auf Glucoselösung in oben beschriebener Weise einwirken lassen. Aber auch hier war keine Bildung eines Disaccharids zu constatiren, Polarisation und Reduktionsvermögen blieben monatelang unverändert.

Wenn durch Maltase nun, wie ich gefunden habe, keine Maltose wieder aus ihren Componenten aufgebaut wird, so bleibt auch die Synthese der Isomaltose durch ein Enzym interessant genug. Die jüngste Zeit hat mehrere solcher synthetischen Wirkungen bekannt gemacht. Augenblicklich beschäftigen mich ausser der Maltase einige Versuche mit Emulsin, Amylase und Invertin; vielleicht überlassen mir die Fachgenossen für einige Zeit dieses Gebiet.

98. Martin Freund und Adolf Friedmann: Zur Kenntniss des Cytisins.

[Mittheilung aus dem chem. Laborat. des physik. Vereins zu Frankfurt a./M.]
(Eingeg. am 16. Febr. 1901; mitgeth. i. d. Sitzung von Hrn. R. Wolfenstein.)

Oxycytisin, $C_{11}H_{14}N_2O_2$.

Durch eingehende Versuche hat Wolfenstein dargethan, dass secundäre Basen vom Typus des Piperidins oder Pyrrolidins durch Wasserstoffsuperoxyd unter Bildung von Amidoaldehyden aufgespalten werden. Da eines der beiden Stickstoffatome des Cytisins, $C_{11}H_{14}N_2O$, wie frühere Untersuchungen von Partheil¹⁾ einerseits, von v. Buchka²⁾ andererseits dargethan haben, in Form einer Imidgruppe vorhanden ist, und da bei dem häufigen Vorkommen von Pyridin- und Pyrrolidin-Complexen in Pflanzenbasen die Vermuthung nicht fern lag, dass auch das vorliegende Alkaloïd eine derartige Bindung enthält, so haben wir das Verhalten des Cytisins gegen Wasserstoffsuperoxyd eingehend studirt und sind dabei auf folgendem Wege zu einem wohlcharakterisirten Körper gelangt:

3 g Cytisin vom Schmp. 152° wurden mit soviel käuflichem, ca. 3-procentigem Wasserstoffsuperoxyd übergossen, dass auf ein Molekül der Base ein Molekül Peroxyd zur Anwendung gelangte. Die Lösung blieb dann bei gewöhnlicher Temperatur so lange stehen, bis sich kein Wasserstoffsuperoxyd mehr nachweisen liess. Dies war gewöhnlich nach etwa 18 Stunden der Fall. Die Flüssigkeit wurde nun mehrmals mit Chloroform extrahirt. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels blieb ein zähes, gelbes Oel zurück, das, mit Aether mehrmals angerieben, allmählich fest wurde und im Vacuumexsiccator sich in eine krümelige Masse verwandelte, welche Fehling'sche Lösung stark reducirte. Da diesem Product noch viel unverändertes

¹⁾ Partheil, diese Berichte **23**, 3201 [1890]; **24**, 674 [1891]. Arch. d. Pharm. **230**, 448 [1892]; **232**, 161 [1894].

²⁾ v. Buchka und Magelhaes, diese Berichte **24**, 253 u. 674 [1891].