

Beitrag zur Kenntnis der Reversibilität der Enzymwirkung.

Von Dr. ADOLF WELTER, Crefeld.

(Eingeg. 26./I. 1911.)

Die uns bekannten Enzyme werden auf Grund ihres Verhaltens zu den Katalysatoren gezählt und gerade die Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß sie auch mit Recht als durch lebende Organismen hervorgebrachte Katalysatoren definiert werden. Von den vielen Eigenschaften, die die Enzyme mit den anorganischen Katalysatoren gemein haben, soll in nachfolgendem von ihrer Reversibilität, also von ihrer Eigenschaft, nicht nur hydrolytische, sondern auch umgekehrt synthetische Wirkungen ausüben zu können, die Rede sein. Daß, wie dies theoretisch vorauszusehen war, Enzyme auch synthetische Reaktionen beschleunigen, hat zuerst Hill¹⁾ bewiesen, indem er durch seine Arbeiten zeigte, daß dasselbe Ferment, welches Maltose in Glucose spaltet, aus einer konz. Lösung von Glucose Maltose zurückbildet. Einen sehr klaren und einfachen Fall von Reversibilität beobachteten Kastle und Loevenhart²⁾ bei der Einwirkung von Lipase auf eine Mischung von Äthylalkohol und Buttersäure. Wenn man zu einer solchen Mischung frischen wässrigen Pankreassaft zusetzt, so entwickelt sich schon nach kurzer Zeit der für den Buttersäureäthylester charakteristische Geruch, und zwar schon bei der Einwirkung in der Kälte und selbst bei Gegenwart von Antiseptics. Wenn man den Pankreasextrakt jedoch vorher erhitzt, wodurch das Enzym infolge seiner organisch-kolloiden Natur zerstört wird, so zeigt sich niemals ein Geruch nach Äthylbutyrat. Bekannt wurde durch die Arbeiten von Visser³⁾ und Tammann, daß ebenso wie Emulsion Salicin durch Hydrolyse in Saligenin und Glykose zu spalten vermag, unter geeigneten Umständen auch wieder aus den Komponenten durch Emulsin das Salicin entsteht. Auch die Synthese des Rohrzuckers durch Invertase aus Glucose und Fructose ist gelungen.

Von besonderem Interesse für die nachfolgenden Ausführungen waren die Arbeiten von Hanriot⁴⁾ über die Einwirkungen der Lipase auf Buttersäure und Glycerin, wobei der Buttersäure-Glycerinester erhalten wurde. Pottévin⁵⁾ gelang es sogar, durch Pankreaslipase die Synthese der Glycerinester der Ölsäure auszuführen.

Auf Grund dieser Arbeiten war es interessant, zu untersuchen, ob das Enzym des Ricinussamens,

das heute in der Fett- und Ölindustrie zur Gewinnung von Fettsäuren und Glycerin eine nicht unbedeutende Rolle spielt, ebenfalls synthetische Wirkungen ausüben kann.

Schon im Jahre 1890 beobachtete Green⁶⁾ bei Gelegenheit pflanzenphysiologischer Untersuchungen und, unabhängig von ihm, Siegmund,⁷⁾ daß beim Verreiben ölhaltiger Pflanzensamen mit Wasser sich geringe Mengen freier Fettsäure bildeten, und schlossen aus diesem Verhalten auf die Existenz eines fettspaltenden Fermentes, das in den Pflanzensamen enthalten sei. Den Umstand, daß die Spaltung bei ihrer Versuchsanordnung nur sehr geringe Grade erreichte, schoben sie auf die Bildung der freien Fettsäure, die nach ihrer Ansicht retardierend auf die lipolytische Wirkung des Pflanzenfermentes einwirkte. Im Jahre 1902 wiesen im Gegensatz zu dieser Ansicht nun Connstein, Hoyer und Wartenberg⁸⁾ durch eine sehr ausführliche und interessante Arbeit nach, daß Grundbedingung für eine gute Spaltung durch Samenferment das Vorhandensein einer ganz bestimmten Menge einer organischen oder Mineralsäure ist. Sie erreichten durch Benutzung des für diese Zwecke bestgeeigneten Samens, und zwar des Ricinussamens bei Gegenwart von Wasser und Säure bei den technischen Fetten und Ölen nahezu theoretisch verlaufende Spaltungen. Es hat sich auf Grund dieser Arbeiten dieses Verfahren in der Technik so gut eingeführt, daß nach der letzten Statistik jährlich 30 000 000 kg Fette und Öle in Fett, Fettsäuren und Glycerin zerlegt werden. Der Spaltungsprozeß wird, wie ich an dieser Stelle nochmals kurz erwähnen will, in nachfolgender Weise ausgeführt: Das zu spaltende Öl oder Fett wird, falls es bei gewöhnlicher Temperatur nicht flüssig ist, einige Grade über seinen Schmelzpunkt erhitzt, mit ca. 30—40% seines Gewichtes an Wasser versetzt und mittels Durchblasens von Luft mit 5% geschältem und gut gemahlenem Ricinussamen unter Zusatz von 0,06% konz. Essigsäure innig verrührt. Nach zwei bis drei Tagen, wenn etwa 90% der Theorie aufgespalten sind, erhitzt man die Reaktionsmasse, fügt ca. 0,25% Schwefelsäure von 60° Bé. zu und erhält so 3 Schichten, eine untere wässrige Glycerinlösung, eine Mittelschicht, aus Samenteilchen, Öl und Glycerinwasser im emulsierten Zustande bestehend, und eine obere, klare Fettsäureschicht. Durch neuere Arbeiten von Connstein und Hoyer ist es nun gelungen, das im Ricinussamen enthaltene wirksame Enzym in konz. Form, in dem sog. „Ferment“ anzureichern, wodurch die Fettspaltung in der Technik sich noch vorteilhafter und einfacher gestaltet hat. Dieses Ferment, das auch zu den später beschriebenen

¹⁾ J. Chem. Soc. Trans. **73**, 634 (1898); ferner Proc. Chem. Soc. **17**, 184 (1901).

²⁾ Am. Chem. J. **24**, 491—525 (1900).

³⁾ Z. f. physik. Chem. **52**, 257, 309 (1905).

⁴⁾ Compt. rend. Soc. de Biol. **53**, 70 (1901) und **132**, 212.

⁵⁾ Compt. rend. Soc. de Biol. **136**, 767 (1903).

⁶⁾ Proc. Royal Soc. **48**, 370 (1890).

⁷⁾ Monatsh. f. Chem. **11**, 272 (1890).

⁸⁾ Berl. Berichte 1902, 3988.

Versuchen benutzt worden ist, wird in nachfolgender Weise dargestellt: Der geschälte Ricinussamen wird in einer Mühle mit Wasser fein vermahlen und die gebildete Samenmilch durch Passieren einer Überlaufzentrifuge mit hoher Umdrehungszahl von den zurückgehaltenen lipolytisch unwirksamen Bestandteilen des Samens getrennt. Die abfließende Emulsion enthält das Ricinusöl in emulgiertem Zustande mit den unlöslichen Eiweißstoffen des Protoplasmas, darunter auch das fettsplattende Enzym. Man überläßt es bei ca. 24° einem Gärungsprozeß, wobei sich das angereicherte Ferment als dicke Sahne an der Oberfläche des sauren Unterwassers absetzt und so durch einfaches Dekantieren leicht gewonnen werden kann. Das so erhaltene sahnartige, konz. Ferment besteht zur Hauptsache aus etwa 38% Ricinusölsäure, 4% Eiweißkörpern resp. fester Masse und 58% Wasser; es enthält eine genügende Menge durch den Gärungsprozeß entstandener freier Säure, größtenteils Essig- und Buttersäure, um den Spaltungsprozeß bei den Fetten und Ölen ohne weiteren Zusatz von Mineralsäure in wünschenswerter Weise zu beschleunigen.

Wenn man z. B. 100 Teile eines technischen Fettes oder Öles mit etwa 6–7 Teilen Ferment und 35–40 Teilen Wasser bei gewöhnlicher Temperatur innig mischt, so erhält man schon nach ein bis zwei Tagen eine Spaltung bis zu 90% der Theorie. Als dann steigt in den weiteren Tagen die Spaltung nur ganz unwesentlich und erreicht schließlich ein Maximum, so daß also ein Gleichgewichtszustand zwischen Neutralfett, Fettsäure und Glycerinwasser eintritt. Wenn man bei der Spaltung nicht, wie oben angegeben, 35–40%, sondern nur 20–25% Wasser verwendet, so wird man finden, daß der Spaltungsprozeß etwas langsamer verläuft, und der endlich erreichte Gleichgewichtszustand ca. 10% der Theorie unter dem oben erwähnten durch größeren Wassergehalt erhaltenen Gleichgewichtszustande liegt. Diese Beobachtung, daß der relative Wassergehalt auf den Gleichgewichtszustand zwischen Neutralfett, Fettsäure und Glycerinwasser von Bedeutung ist, legt die Vermutung nahe, daß die Wirkung des Fermentes unter bestimmten Umständen auch eine reversible sein könnte, und wenn man die Fermente als Katalysatoren auffaßt, so ist diese Reversibilität auch theoretisch vor auszusehen. Wie sich nun bei den nachfolgend beschriebenen Versuchen zeigte, konnte ich auch den Nachweis für die Reversibilität der Ricinusenzymwirkung erbringen, denn es ist mir gelungen, durch Verminderung des Wassergehaltes, d. h. durch Einwirkung des Fermentes auf 100%ige Fettsäure und nahezu wasserfreies Glycerin in dem Reaktionsgemisch lediglich durch die katalytische Wirkung des Fermentes bis zu 35% Neutralfett synthetisch herzustellen. Zu diesem Zwecke wurde in nachfolgender Weise verfahren:

Je 100 Teile der Fettsäure wurden mit 20 T. 96%igem, reinem, doppelt destilliertem Glycerin kalt innig vermischt und alsdann 10 T. Ricinusferment eingetragen. Bei einem Parallelversuch wurde, um die katalytische Wirkung des Fermentes aufzuheben, das Ferment in das vorher auf 60–80° erwärmte Fettsäure-Glyceringemisch eingerührt. Nach etwa zwei Tagen wurden beide Versuche unter Zusatz von Wasser und etwas Schwefelsäure aufge-

kocht, das in der Fettsäure enthaltene Glycerin mit Wasser ausgewaschen und alsdann durch Bestimmung der Säurezahl der Gehalt an Neutralfett festgestellt. Es zeigte sich jedesmal, daß bei der Vermischung des Fettsäure-Glyceringemisches in der Kälte mit Ferment sich die katalytische Wirkung in der Weise entfaltet, daß ein bestimmter Teil der Fettsäure mit dem Glycerin zu Neutralfett kondensiert wurde, was sich durch Erniedrigung der Säurezahl erkennen ließ. Bei dem Parallelversuch, bei dem die katalytische Wirkung durch vorheriges Erwärmen der Reaktionsmasse ausgeschaltet wurde, war keine synthetische Einwirkung zu konstatieren, was sich dadurch zeigte, daß die Säurezahl mit derjenigen der ursprünglich angewandten Fettsäure nahezu gleich blieb, d. h. nur so viel niedriger wurde, als es die Vermischung der in dem Ferment enthaltenen Ricinusölsäure mit der angewandten Fettsäure bedingte. Von der Verwendung eines Aktivators, z. B. Mangansulfat, der die Spaltung durch Enzyme vorteilhaft beeinflusst, wurde bei den Versuchen abgesehen. Die zu den Versuchen verwendeten Fettsäuren wurden erhalten, indem man das Neutralfett in alkoholischer Kalilauge auf dem Wasserbade vollständig verseifte und nach dem Verjagen des Alkohols die Seife mit verd. Schwefelsäure zersetzte. Bei einigen Versuchen anhydrierte sich beim Aufkochen mit verd. Schwefelsäure die Fettsäure etwas, so daß durch Anhydrid- oder Lactonbildung die Säurezahlen etwas unter den normalen lagen. Vor allen Dingen war dieses bei der Ricinusölfettsäure der Fall. Die nachfolgende Tabelle zeigt die bei den Versuchen erhaltenen Resultate.

Angewandte Fettsäure	Säurezahl der Fettsäure	Säurezahl nach der Behandlung mit Ferment		Zurückgebild. Neutralfett ca. %
		in der Kälte	in der Wärme	
1. Palmkernölfettsäure	254,2	164,0	—	35
„ „ „ „ „	254,2	—	246,0	—
2. Cocosölfettsäure	262,0	207,0	—	21
„ „ „ „ „	262,0	—	254,0	—
3. Maisölfettsäure	180,3	140,0	—	22
„ „ „ „ „	180,3	—	179,0	—
4. Erdnuölfettsäure	180,0	146,0	—	19
„ „ „ „ „	180,0	—	179,0	—
5. Ricinusölfettsäure	153,0	132,0	—	14
„ „ „ „ „	153,0	—	153,2	—
6. Olein dopp. dest. weiß	196,0	145,0	—	26
„ „ „ „ „	196,0	—	194,4	—
7. Cottonöl	202,0	183,0	—	7
„ „ „ „ „	202,0	—	197	—

Es wäre nun die Annahme möglich, daß die Erniedrigung der Säurezahl durch die Einwirkung des Fermentes lediglich dadurch entstanden ist, daß das Ferment nur anhydrierend, also anhydrid- oder lactonbildend auf die Fettsäure eingewirkt hat. Um diesem Einwand zu begegnen, wurden die vorstehenden Fettsäuren mit Ferment in der Kälte ohne Zusatz von Glycerin behandelt, wobei die Säurezahl jedoch nicht verändert wurde.

Daß es sich bei der Einwirkung des Enzyms nicht um eine Anhydrierung, sondern tatsächlich

um eine Synthese eines Glycerinesters handelt, geht auch noch aus den nachfolgenden Versuchen hervor:

100 T. Palmkernölfettsäure 100%ig,
40 T. Glycerin 96%ig, rein,
10 T. Ferment

wurden zwei Tage gut verrührt. Die ursprüngliche Säurezahl der Palmkernölfettsäure von 254 war hierauf durch die partielle Bildung des Glycerinesters auf 161 gesunken. Es wurden hierauf 100 T. Wasser von 35° eingerührt, worauf nach einem Tage schon die Säurezahl auf 185 gestiegen war. Ein weiterer Zusatz von 100 T. Wasser von 35° bewirkte nach einem Tage schon die Erhöhung der Säurezahl auf 197,3, und am darauffolgenden Tage war die Säurezahl auf 214 gestiegen. Derselbe Versuch wurde mit doppelt dest., weißem Olein ausgeführt, wobei ohne Wasserzusatz die Säurezahl von 196 auf 145 sank und auf Zusatz von Wasser schließlich wieder auf 171 gebracht werden konnte. Wie diese Versuche also augenscheinlich zeigen, tritt bei der Anwesenheit von nur ganz geringen Mengen Wasser eine Synthese ein, die schließlich einen Gleichgewichtspunkt erreicht, der durch den Zusatz von Wasser, welches eine Hydrolyse bedingt, wieder verschoben wird.

Beim Verseifen der rückgebildeten Neutralfette wurde stets wieder die ursprüngliche Säurezahl der angewandten Fettsäuren erhalten; bei den etwas anhydrierten Fettsäuren war in diesem Falle naturgemäß die Säurezahl etwas höher. Versuch 4 mit Erdnußölfettsäure wurde mit größeren Mengen wiederholt, um das rückgebildete Neutralfett rein zu isolieren. Zu diesem Zwecke wurde das Neutralfett-Fettsäuregemisch mit der zehnfachen Menge Wasser versetzt, mit Natronlauge unter Zusatz von etwas Kochsalz vorsichtig neutralisiert und die Emulsion mit Petroläther ausgeschüttelt. Nach dem Entwässern des Äthers und nach gutem Filtrieren wurde nach dem Verdampfen fast reines neutrales Erdnußöl gewonnen, das eine Säurezahl von 0,7 zeigte und nach dem Verseifen wieder eine reine Erdnußölfettsäure mit der Säurezahl 189,3 lieferte. In gleicher Weise wurde das durch Versuch 1 erhaltene Palmkernöl-Fettsäuregemisch ebenfalls nach dem Neutralisieren mit Natronlauge mit Petroläther behandelt, und auf diese Weise ein farbloses Fett isoliert, welches eine Säurezahl von 0,23 zeigte. Das bei der Verseifung dieses Fettes erhaltene Glycerin wurde sowohl durch verschiedene Reaktionen als Glycerin charakterisiert, wie auch durch die Hahn'sche Bichromatmethode quantitativ bestimmt, wobei annähernd die theoretisch zu erwartenden Werte erhalten wurden.

Ber. ca. 13,3% Glycerin. Gefunden 14,5% Glycerin. Die Verseifungszahl des auf vorstehende Weise synthetisch erhaltenen Palmkernöls wurde mit 235 ermittelt, die nach der Verseifung wieder ausgeschiedene Fettsäure zeigt eine Säurezahl von 241. Es unterliegt deshalb wohl keinem Zweifel, daß fast ausschließlich das neutrale Triglycerid der Palmkernölfettsäuren vorlag.

Weitere Untersuchungen, ob bei der Synthese durch Ricinusferment lediglich Triglycerin oder auch Mono- und Diglycerine entstehen, sollen noch ausgeführt werden. Desgleichen soll auch untersucht werden, ob sich bei der Synthese durch

Ferment die Fettsäuren mit höherem Molekulargewicht leichter kondensieren als diejenigen mit niedrigerem Molekulargewicht, entsprechend der leichteren hydrolytischen Spaltung höherer Fettsäuren gegenüber den niedrigeren Fettsäuren.

Die vorstehend behandelte Reversibilität der Enzymwirkung hat besondere Bedeutung für die Tier- und Pflanzenphysiologie, denn wir wissen, daß sich im lebenden Organismus Tausende von katalytischen Prozessen zwischen den Geweben und den Flüssigkeiten abspielen. Ob nun der Prozeß im Sinne einer Spaltung oder Synthese verläuft, hängt, wie wir gesehen haben, von dem relativen Verhältnis der einzelnen Reaktionsprodukte untereinander ab. Bei der Hydrolyse wird also der End- oder Gleichgewichtszustand der Theorie am nächsten kommen, je mehr die Reaktionsprodukte mit Wasser verdünnt werden. Wird umgekehrt das Wasser entfernt, so wird sich der Gleichgewichtszustand nach der anderen Seite verschieben, und es wird eine Synthese eintreten. Besonders bedeutungsvoll wird diese Reversibilität für die Physiologie des lebenden Organismus, wenn es sich um synthetische Prozesse handelt, bei denen der Gleichgewichtszustand dadurch aufrecht erhalten wird, daß das durch die Synthese gebildete Produkt durch Diffusion in die Blutbahn entfernt wird, oder wo das Produkt unlöslich ist und nach der Bildung sofort aus der Reaktion ausscheidet, wie z. B. bei der Stärkebildung in den Pflanzen oder der Glykogenbildung im Tierorganismus.

Für den Glycerin- und Fettsäurechemiker hat die Erkenntnis der reversiblen Wirkung der Enzyme auch eine praktische Bedeutung. Da es ihm darauf ankommt, aus den Fetten recht viel Glycerin zu gewinnen, so sucht er mit dem Gleichgewichtszustand möglichst nahe an den Punkt der vollständigen Hydrolyse heranzukommen, indem er in verhältnismäßig großer Verdünnung arbeitet, wobei ihm jedoch praktische Grenzen dadurch gezogen sind, daß schließlich sich der Vorteil einer etwas höheren Hydrolyse und der Nachteil der starken Glycerinverdünnung das Gleichgewicht halten.

[A. 91.]

Kritische Betrachtungen über den Intensivbetrieb in der Schwefelsäurefabrikation.¹⁾

Dipl.-Ing. chem. AUREL NEMES, Brüssel.

(Eingeg. 12./I. 1911.)

Eine der ältesten und vielleicht der mannigfaltigsten durchgearbeiteten Industrien der Chemie ist die Schwefelsäurefabrikation in Bleikammern. Wir sollten daher fast glauben, daß die wesentlichsten theoretischen wie praktischen Fragen darin ein für allemal gelöst seien, wie das auf so manchen Gebieten der chemischen Industrie der Fall ist. Demgegenüber ist jedoch bekannt, daß die Theorie der Schwefelsäurebildung bei dem Kammervorgang

¹⁾ Vortrag, gehalten im Bezirksverein Belgien (Brüssel) am 17. Dezember 1910.