

Rohde in der Carminsäure angenommenen Molekeln Wasser noch eine dritte enthalten ist.

Die Substanz wurde für die Analyse im Kohlensäurestrom bei 120° getrocknet, wobei sie sich etwas dunkler färbte. Höheres Erhitzen war nicht rathsam, da das Product anscheinend etwas angegriffen wird.

Analyse der reinsten Probe:

Ber. Procente: C 61.26, H 5.70, N 4.20

Gef. » » 61.32, » 5.20, » 3.98.

Ueber die Natur der erwähnten Molekeln Wasser können keine Vermuthungen aufgestellt werden. Es ist wohl nicht anzunehmen, dass zwei von denselben im Anilid ebenso gebunden sind, wie es von v. Miller und Rohde für die beiden Wassermolekeln der Carminsäure angenommen wurde, obwohl ein sicherer Blick für diese Verhältnisse nur dann gewonnen wäre, wenn Körper wie Leukonsäure oder Trichinoyl auf ihr Verhalten primären Aminen gegenüber eingehend geprüft sind.

Erwähnt sei schliesslich noch, dass sich das Carminsäureanilid siedenden Alkalien gegenüber ebenso verhält wie α -Naphtochinonanilid, d. h. es liefert Anilin, welches durch Destillation mit Leichtigkeit nachgewiesen werden konnte. Hierbei bleibt im Rückstande (den qualitativen Reactionen nach zu schliessen) Carminsäure zurück, und nicht etwa eine Oxycarminsäure, ein Umstand der dafür spricht, dass der Anilinrest im Anilid der Carminsäure jedenfalls nicht an solchem Orte der Molekel substituirt war, dass seine Eliminirung die Substitution einer Hydroxylgruppe zur Folge hätte.

Kersal, Manchester.

545. Emil Fischer: Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme.

[Aus dem I. Berliner Universitäts-Laboratorium.]

(Vorgetragen in der Sitzung vom Verfasser.)

Das verschiedene Verhalten der stereoisomeren Hexosen gegen Hefe hat Thierfelder und mich zu der Hypothese geführt, dass die activen chemischen Agentien der Hefezelle nur in diejenigen Zucker eingreifen können, mit denen sie eine verwandte Configuration besitzen¹⁾.

Diese stereochemische Auffassung des Gährprocesses musste an Wahrscheinlichkeit gewinnen, wenn es möglich war, ähnliche Ver-

¹⁾ Diese Berichte 27, 2036.

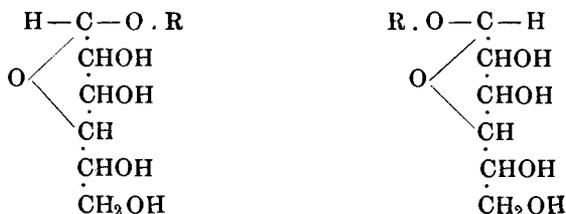
schiedenheiten auch bei den vom Organismus abtrennbaren Fermenten, den sogenannten Enzymen, festzustellen.

Das ist mir nun in unzweideutiger Weise zunächst für zwei glucosidspaltende Enzyme, das Invertin und Emulsin, gelungen. Das Mittel dazu boten die künstlichen Glucoside, welche nach dem von mir aufgefundenen Verfahren aus den verschiedenen Zuckern und den Alkoholen in grosser Zahl bereitet werden können¹⁾. Zum Vergleich wurden aber auch mehrere natürliche Producte der aromatischen Reihe und ebenso einige Polysaccharide, welche ich als die Glucoside der Zucker selbst betrachte, in den Kreis der Untersuchung gezogen. Das Ergebniss derselben lässt sich in den Satz zusammenfassen, dass die Wirkung der beiden Enzyme in auffallender Weise von der Configuration des Glucosidmoleküls abhängig ist.

Versuche mit Invertin.

Das Enzym lässt sich bekanntlich aus der Bierhefe mit Wasser auslaugen und soll aus der Lösung durch Alkohol unverändert gefällt werden. Aus den später angeführten Gründen habe ich auf die Isolirung desselben verzichtet. Die nachfolgenden Versuche sind vielmehr direct mit einer klar filtrirten Lösung angestellt, welche durch 15 stündige Digestion von 1 Theil lufttrockener Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Typus Froberg, Reincultur) mit 15 Theilen Wasser bei 30—35° bereitet war.

Alkoholglucoside. Wie ich früher dargelegt habe, lässt die von mir experimentell sehr wahrscheinlich gemachte Glucosidformel die Existenz von 2 Stereoisomeren voraussehen, welche sich nur durch die Anordnung an dem asymmetrischen Kohlenstoff der Glucosidogruppe unterscheiden. Für die Derivate der Hexosen würden dieselben folgende Configurationen haben:



Von den beiden Verbindungen des Traubenzuckers mit dem Methylalkohol habe ich eine isolirt und als Methylglucosid beschrieben. Die zweite entsteht, wie ich ganz richtig vermuthete, gleichzeitig und befindet sich in der syrupösen Mutterlauge²⁾. In der Isolirung derselben ist mir aber Hr. Alberda van Ekenstein³⁾ zuvor-

¹⁾ Diese Berichte 26, 2400.

²⁾ Diese Berichte 26, 2404.

³⁾ Recueil d. trav. chim. d. Pays-Bas. 13, 183.

gekommen. Mit einer Probe der Krystalle, welche derselbe mir gütigst überlassen hat, konnte ich die Substanz dann ebenfalls krystallisirt erhalten.

Ich schlage vor, das neue Isomere als β -Verbindung von dem älteren α -Methylglucosid zu unterscheiden und die gleiche Bezeichnungsweise für alle Isomeren derselben Ordnung vorläufig zu gebrauchen. Wie ich früher schon mitgetheilt habe, wird das α -Methylglucosid durch das Invertin gespalten. Nach 20 stündiger Wirkung der zehnfachen Menge obiger Enzymlösung bei $30-35^{\circ}$ war ungefähr die Hälfte in Traubenzucker verwandelt.

Unter denselben Bedingungen blieb das β -Methylglucosid ganz unverändert. Das ist besonders auffallend, da dasselbe nach der Beobachtung von v. Ekenstein durch verdünnte Säuren viel rascher als das Isomere hydrolysirt wird.

Das krystallisirte Aethylglucosid¹⁾ verhält sich gegen Invertin, wie die α -Methylverbindung und gehört also offenbar zur α -Reihe.

Benzyl- und Glycerinlucosid wurden bisher nicht krystallisirt erhalten. Die amorphen Producte sind höchst wahrscheinlich ein Gemisch von α - und β -Verbindung. In der That werden sie durch das Invertin angegriffen, aber unvollständiger gespalten als die reinen α -Glucoside.

Alle übrigen bisher bekannten Alkoholglucoside, welche sich von anderen Zuckerarten ableiten, wie Methyl- und Aethyl-Galactosid, Methyl-, Aethyl- und Benzyl-Arabinosid, Methyl- und Aethyl-Rhamnosid, werden von der Enzymlösung garnicht angegriffen. Die fünf ersten sind krystallisirt, und man könnte denken, dass sie die β -Formen darstellen; ich halte das aber für unwahrscheinlich, da sie genau so wie das α -Methylglucosid bereitet wurden. Immerhin ist es wünschenswerth, auch hier die Isomeren zu suchen und ihr Verhalten gegen das Enzym zu prüfen.

Besonderes Interesse schien mir endlich die Prüfung eines Derivats der *l*-Glucose darzubieten. Ich habe deshalb die Methylverbindung derselben, welche ich Methyl-*l*-Glucosid nennen will, in derselben Weise wie das α -Methylderivat des Traubenzuckers dargestellt.

Leider konnte für den Versuch keine reine krystallisirte *l*-Glucose benutzt werden, weil sie zu schwer zugänglich ist, und in Folge der Verwendung von nicht ganz reinem Zucker ist bisher die Isolirung der krystallisirten Glucoside misslungen. Dagegen wurde ein Syrup erhalten, welcher unzweifelhaft die Glucoside und zwar nach der Bereitungsweise hauptsächlich die α -Verbindung enthält. Da ferner das Präparat ganz frei von Zucker war, so konnte die Wirkung der

¹⁾ E. Fischer und L. Beensch, diese Berichte 27, 2479.

Sie würden sich also zu einander verhalten wie Methylglucosid zu Methylgalactosid, von welchen nur das erstere durch Invertin zerlegt wird.

Inulin und Stärke in Form von Stärkekleister werden durch die Invertinlösung nicht verändert ¹⁾.

Aromatische Glucoside. Auf Salicin, Coniferin, Phloridzin und das von Michael künstlich dargestellte Phenolglucosid ²⁾ übt die Invertinlösung keine Wirkung aus; dagegen spaltet sie aus dem Amygdalin mit Leichtigkeit Traubenzucker ab. Da hierbei aber weder Bittermandelöl noch Blausäure entstehen, so ist der Vorgang offenbar ganz anders, als bei der Einwirkung von Emulsin. Es scheint vielmehr, dass von den beiden Molekülen Traubenzucker, welche im Amygdalin vielleicht als Maltose enthalten sind, nur die Hälfte durch das Invertin herausgelöst wird. Diese Beobachtung deutet auf eine Art der Glucosidspaltung, welche bis jetzt ohne Analogie dasteht, und ich werde dieselbe weiter verfolgen.

Ueber die praktische Behandlung der Invertinlösung ist noch Folgendes zu bemerken. Wenn dieselbe nicht mit antiseptischen Mitteln versetzt ist oder nicht sehr kalt gehalten wird, so beginnt sie schon nach einigen Tagen zu faulen, wobei sie trübe wird und einen üblen Geruch annimmt. Bei den hydrolytischen Versuchen kann man diese Gefahr, welche durch die höhere Temperatur vergrößert wird, durch Zusatz von Chloroform vermeiden, denn dasselbe verhindert die Wirkung des Enzyms nicht. Anders verhält sich das Phenol, welches in der Lösung sofort einen Niederschlag erzeugt; schon bei Zusatz von 1 pCt. Phenol zur frischen Enzymlösung war die Hydrolyse merklich verringert und bei 2½ pCt. war sie gänzlich aufgehoben. In allen Fällen aber ist es rathsam, die Enzymlösung frisch bereitet zu verwenden. An Stelle derselben kann man übrigens auch direct die mit Wasser angeschlemmte Hefe benutzen, wenn die Lebensfähigkeit der Zellen und die damit verknüpfte Gährwirkung in der bekannten Weise durch Zusatz von Chloroform aufgehoben wird.

Alle zuvor beschriebenen Versuche wurden mit *Saccharomyces cerevisiae*, Typus Froberg, angestellt. Ich habe mich aber überzeugt, dass der Typus Saaz sowohl auf die Alkoholglucoside wie auf die Maltose in der gleichen Weise wirkt. Dagegen darf man erwarten, dass die *Saccharomyces*-Arten, welche Maltose nicht vergähren, wie *S. exiguus*, *Ludwigii* oder *apiculatus* auch kein Glucosid spaltendes Enzym bereiten. Für die Milchzuckerhefe kann ich schon jetzt die Richtigkeit dieser Annahme behaupten.

¹⁾ Dass Inulin von dem nach der Vorschrift von Barth isolirten Invertin nicht verändert wird, hat schon Kiliani (Ann. d. Chem. 205, 189) beobachtet.

²⁾ Michael, Compt. rend. 89, 355.

Anders als die frisch bereitete Enzymlösung verhält sich das feste käufliche Invertin; denn ein von E. Merck in Darmstadt bezogenes Präparat zeigte zwar noch eine ziemlich kräftige Wirkung auf Rohrzucker, liess aber das α -Methyl-Glucosid und die Maltose unverändert. Ob diese Abschwächung der Wirksamkeit durch die angewandte Hefe oder die Art der Isolirung bedingt ist, oder ob neben dem bekannten Invertin in der Hefe ein neues, stärker hydrolysirendes Enzym enthalten ist, hoffe ich bald durch den Versuch entscheiden zu können.

Versuche mit Emulsin.

Für dieselben diente ein von E. Merck bezogenes Präparat, welches eine kräftige Wirkung auf Amygdalin ausübte. 1 Theil des Enzyms wurde mit 2 Theilen des zu prüfenden Glucosids und 20 Theilen Wasser 15—20 Stunden bei 30—35° gehalten.

Mit dem Invertin stimmt das Emulsin insofern genau überein, als es nur die Glucoside des Traubenzuckers angreift, dagegen die früher erwähnten Galactoside, Arabinoside, Rhamnoside und das Methyl-*l*-Glucosid unverändert lässt.

Dagegen zeigt sich ein scharfer Unterschied der beiden Enzyme gegenüber dem α - und β -Methylglucosid; denn wie das erste von dem Invertin, so wird das zweite ausschliesslich von dem Emulsin angegriffen. Ein quantitativer Versuch ergab, dass von dem β -Methylglucosid unter den oben erwähnten Bedingungen 90 pCt. durch das Emulsin in Traubenzucker verwandelt waren, während unter denselben Verhältnissen die α -Verbindung keine nachweisbare Hydrolyse erfuhr.

Allerdings werden die Glucoside des Glycerins und Benzylalkohols nicht allein von Invertin, sondern auch von dem Emulsin theilweise gespalten. Aber diese amorphen Producte sind offenbar, wie man schon aus der Art der Darstellung schliessen muss und wie schon oben betont wurde, Gemische von α - und β -Verbindung.

Dass viele natürliche aromatische Glucoside, wie Salicin, Coniferin, Arbutin u. s. w. oder das künstlich bereitete Phenolglucosid durch Emulsin hydrolysirt werden, ist bekannt. Da dieselben Producte vom Invertin nicht angegriffen werden, obschon die dabei entstehenden Phenole dem letzteren wegen der grossen Verdünnung keinen Schaden thun könnten, so darf man annehmen, dass jene Glucoside der β -Reihe (Analoge des β -Methylglucosids) angehören.

Maltose¹⁾ und Rohrzucker werden von Emulsin unter den oben angegebenen Bedingungen nicht in nachweisbarer Menge gespalten. Die Wirkung des Emulsins auf den Milchzucker scheint noch nicht

¹⁾ Vergl. v. Mering, Zeitschr. für physiolog. Chemie 5, 190.

geprüft worden zu sein. Zu meiner Ueberraschung habe ich gefunden, dass hier die Hydrolyse leicht stattfindet. Eine Lösung von 2 g Milchzucker in 20 ccm Wasser wurde mit 0.5 g Emulsin versetzt und 22 Stunden auf 35° erwärmt. Zum Nachweis der Spaltungsproducte diente die Osazonprobe. Zu dem Zwecke wurde die Flüssigkeit mit wenig Natriumacetat versetzt, auf dem Wasserbade einige Minuten erwärmt, von dem ausgefallenen amorphen Niederschlag abfiltrirt und nach Zusatz von 2 g Phenylhydrazin und 0.7 g reiner Essigsäure 1¼ Stunden auf dem Wasserbade erhitzt. Der schon in der Wärme entstehende Niederschlag der Osazone wurde nach dem Erkalten filtrirt und durch Auskochen mit viel Wasser vom Lactosazon befreit. Der Rückstand betrug 0.6 g. Aus verdünntem Alkohol umkrystallisirt schmolz derselbe bei 203—205° und zeigte die Zusammensetzung der Phenylhexosazone (Gef. N 15.7 Ber. N 15.6). Das Präparat war unzweifelhaft Hexosazon und zwar ein Gemisch von Glucosazon und Galactosazon.

Bei Maltose und Milchzucker zeigt sich also ein ähnlicher Gegensatz zwischen Invertin und Emulsin, wie bei den α - und β -Glucosiden, obschon der Unterschied in der Configuration der beiden Zucker von anderer Ordnung ist.

Enzym der Kefirkörner.

Nachdem die Wirkung des Invertins auf die Maltose beobachtet und dadurch die directe Vergährbarkeit des Zuckers recht zweifelhaft geworden war, lag die Vermuthung nahe, dass die Milchzuckerhefe auch ein Enzym bereite, welches den Milchzucker spalte und so dessen Gährung ermögliche. Leider stand mir nicht soviel reine Milchzuckerhefe zur Verfügung, um den Versuch ebenso wie mit Bierhefe durchzuführen. Ich habe deshalb zunächst Kefirkörner benutzt. Das Resultat entsprach den Erwartungen. Der durch ein Pukall'sches Thonfilter klar filtrirte wässrige Auszug der Körner zerlegte reichliche Mengen von Milchzucker bei 30—35° im Laufe von 20 Stunden in seine Componenten, welche wie oben durch die Osazonprobe nachgewiesen wurden. Unter denselben Bedingungen blieb die Maltose unverändert. Ich werde das Experiment sobald wie möglich mit reiner Milchzuckerhefe wiederholen und auch die Isolirung des Enzyms versuchen.

Dass ein solches Milchzucker spaltendes Agens in *Saccharomyces* Kefir und in *Saccharomyces Tyrocola* (Käsehefe) enthalten sei, ist schon von Beyerinck¹⁾ behauptet worden. Aber die Art, wie er die Wirkung der sogen. »Lactase« auf den Milchzucker mit Hilfe

¹⁾ »Die Lactase, ein neues Enzym« (Centralbl. für Bacteriologie und Parasitenkunde 6, S. 44).

von Leuchtbakterien beweisen will, ist wohl geeignet, ernste Bedenken gegen die Zuverlässigkeit des Resultats zu erwecken. In der That ist denn auch Beyerinck's Ansicht von Schnurman's Stekhoven¹⁾ sehr bestimmt bestritten worden. Letzterer kommt vielmehr zu dem Schluss, dass das Enzym der Kefirhefe zwar den Rohrzucker und die Raffinose, aber nicht den Milchzucker zerlege. Die Frage, wer hier Recht hat, lässt sich leicht entscheiden, wenn man den Versuch mit reiner Kefirhefe so anstellt, wie er oben für die Kefirkörner beschrieben ist. Ich werde denselben ausführen, so bald mir eine genügende Menge der Hefe zur Verfügung steht.

Ferner beabsichtige ich, noch einige verwandte Enzyme, wie die Glucose, das Ptyalin, Myrosin und die Pancreasfermente zum Vergleiche heranzuziehen und die Versuche auch auf die selteneren Polysaccharide, wie Isomaltose, Turanose, Melibiose, Melitriose, Trehalose, Melezitose, die künstlichen Dextrine etc. zu übertragen. Zweifellos werden sich dann noch mehr solcher Gegensätze zeigen, wie sie zwischen dem Invertin und Emulsin jetzt festgestellt sind.

Aber schon genügen die Beobachtungen, um principiell zu beweisen, dass die Enzyme bezüglich der Configuration ihrer Angriffsobjecte ebenso wählerisch sind, wie die Hefe und andere Mikroorganismen. Die Analogie beider Phänomene erscheint in diesem Punkte so vollkommen, dass man für sie die gleiche Ursache annehmen darf, und damit kehre ich zu der vorher erwähnten Hypothese von Thierfelder und mir zurück. Invertin und Emulsin haben bekanntlich manche Aehnlichkeit mit den Proteinstoffen und besitzen wie jene unzweifelhaft ein asymmetrisch gebautes Molekül. Ihre beschränkte Wirkung auf die Glucoside liesse sich also auch durch die Annahme erklären, dass nur bei ähnlichem geometrischem Bau diejenige Annäherung der Moleküle stattfinden kann, welche zur Auslösung des chemischen Vorganges erforderlich ist. Um ein Bild zu gebrauchen, will ich sagen, dass Enzym und Glucosid wie Schloss und Schlüssel zu einander passen müssen, um eine chemische Wirkung auf einander ausüben zu können. Diese Vorstellung hat jedenfalls an Wahrscheinlichkeit und an Werth für die stereochemische Forschung gewonnen, nachdem die Erscheinung selbst aus dem biologischen auf das rein chemische Gebiet verlegt ist. Sie bildet eine Erweiterung der Theorie der Asymmetrie, ohne aber eine directe Consequenz derselben zu sein; denn die Ueberzeugung, dass der geometrische Bau des Moleküls selbst bei Spiegelbildformen einen so grossen Einfluss auf das Spiel der chemischen Affinitäten ausübe, konnte meiner Ansicht nach nur durch neue thatsächliche Beobachtungen gewonnen werden. Die bis-

¹⁾ Koch's Jahresbericht über Gährungsorganismen 1891, 136.

herige Erfahrung, dass die aus zwei asymmetrischen Componenten gebildeten Salze sich durch Löslichkeit und Schmelzpunkt unterscheiden können, genügt dafür sicher nicht. Dass man die zunächst nur für die complicirten Enzyme festgestellte Thatsache bald auch bei einfacheren asymmetrischen Agentien finden wird, bezweifle ich ebensowenig wie die Brauchbarkeit der Enzyme für die Ermittlung der Configuration asymmetrischer Substanzen.

Die Erfahrung, dass die Wirksamkeit der Enzyme in so hohem Grade durch die moleculare Geometrie beschränkt ist, dürfte auch der physiologischen Forschung einigen Nutzen bringen. Noch wichtiger für dieselbe aber scheint mir der Nachweis zu sein, dass der früher vielfach angenommene Unterschied zwischen der chemischen Thätigkeit der lebenden Zelle und der Wirkung der chemischen Agentien in Bezug auf moleculare Asymmetrie thatsächlich nicht besteht. Dadurch wird insbesondere die von Berzelius, Liebig u. A. so häufig betonte Analogie der »lebenden und leblosen Fermente« in einem nicht unwesentlichen Punkte wieder hergestellt. —

Bei der Ausführung obiger Versuche habe ich mich der eifrigen und geschickten Beihülfe des Hrn. Dr. Paul Rehländer erfreut. Ferner bin ich für die Ueberlassung von reingezüchteten Hefen den HH. Dr. H. Thierfelder, Prof. M. Delbrück und Dr. O. Reinke zu grossem Danke verpflichtet.

546. Rob. Henriques: Ueber Thioderivate des β -Naphthols.

(Vorgetragen in der Sitzung vom Verfasser.)

Studien, die auf einem vollkommen anderen Gebiete liegen, haben mich veranlasst, die Einwirkung des gewöhnlichen Halbchlorschwefels, S_2Cl_2 , auch auf verschiedene Körperklassen der aromatischen Reihe zu studiren, und es hat sich dabei gezeigt, dass dieses Reagens in erster Linie mit Phenolen und Phenoläthern in glatter Weise derart reagirt, dass das gesammte Chlor in Form von Salzsäure abgespalten wird, während der Schwefel in organische Bindung tritt. Genauer ist nun die Umsetzung zwischen β -Naphtol und Chlorschwefel verfolgt worden; über die dabei erhaltenen Resultate geben die folgenden Zeilen Rechenschaft.

Man leitet die in Rede stehende Reaction, die sich zwischen 2 Molekülen Naphtol und 1 Molekül Chlorschwefel abspielt, am besten wie folgt. β -Naphtol wird in der fünffachen Menge Chloroform gelöst und in die beim Erkalten zu einem Brei erstarrende Masse die theoretische Menge Chlorschwefel, mit Chloroform verdünnt, eingetröpfelt.