

Ein Chemiker wird doch keinen Zweifel daran haben<sup>1)</sup>, dass, wenn ich 1 g von löslicher Stärke und 0.01 g von einem Diastasepräparate genommen habe, dieses Präparat keine 2000-fache Menge seines Gewichtes von Maltose erzeugen konnte.

In der Arbeit von Osborne haben wir eine Illustration dazu, was Herbert Spencer von der Schädlichkeit der vorausgesetzten Hypothesen gesagt hat. In seiner Mittheilung sagt nämlich Osborne, dass er zur Trennung der Proteinstoffe von den Kohlenhydraten das Aussalzen als die rationellste Methode angewendet hat<sup>2)</sup>. Diese, wie wir jetzt wissen, falsche vorausgesetzte Hypothese diente ihm als Wegweiser nicht nur in dieser Arbeit, sondern auch bei der Darstellung der Proteinstoffe verschiedener Getreidearten<sup>3)</sup>.

K. K. allg. Unters.-Anst. f. Lebensmittel in Krakau.

### 191. A. Wróblewski: Ueber die chemische Beschaffenheit der amylolytischen Fermente.

(Vorläufige Mittheilung.)

[Vorgelegt der Academie der Wissenschaften in Krakau am 4. April 1898.]

(Eingegangen am 21. April.)

Meine bisherigen Beobachtungen betreffen Diastase, Takadiastase, Invertin und zum Theil Ptyalin.

Diastase. Was Diastase anbetrifft, so wurden in einer schon publicirten Arbeit<sup>4)</sup> genügende Beweise dafür gebracht, dass Diastase den Proteinstoffen angehört. Vor Kurzem habe ich eine neue Untersuchungsreihe über die Diastase vorgenommen, mit der Absicht, dieses Ferment in einem ganz reinen und unveränderten Zustande zu erhalten, aber bisher standen sehr grosse Schwierigkeiten bei der Isolirung der reinen und ganz unveränderten Diastase aus ihrer Verbindung mit dem Jodkaliumquecksilberjodid im Wege. Nach den in verschiedenen Richtungen angestellten Proben habe ich die Methode der fractionirten Aussalzung angewendet.

<sup>1)</sup> Osborne, Die chemische Natur der Diastase. Diese Berichte 31, 255.

<sup>2)</sup> »The most rational method is first to separate the proteids from the carbohydrates and other soluble substances by saturating the extract with ammonium sulphate, thereby precipitating the ferment and proteids together...« l. c. pg. 194.

<sup>3)</sup> Diese Bemerkungen beziehen sich nicht auf die Arbeit von Chittenden und Osborne: Die Proteide des Maisornes.

<sup>4)</sup> Diese Berichte 30, 2289.

Aus den neuen Versuchen geht hervor, dass beim Sättigen der Lösung mit Hilfe von Natriumchlorid oder Natriumsulfat unter Zusatz von wenig Essigsäure oder sogar Salzsäure und Erwärmen bis 60° kein Niederschlag entsteht. Wenn ich aber zu einer Lösung, welche Diastase neben dem Arabane enthielt und nach einer früher von mir beschriebenen Methode aus dem Malze dargestellt wurde, eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung tropfenweise zusetzte, so trat ein Moment ein, in welchem die vorher vollkommen klare Flüssigkeit nach dem Zusatz neuer Mengen des Reagens getrübt wurde. Nach einiger Zeit hat sich diese Trübung in Form von gelblichen Flöckchen auf dem Boden des Gefässes gesammelt. Die Flüssigkeit enthielt ca. 50 pCt. schwefelsaures Ammonium in Lösung. Der erhaltene Niederschlag wurde mit einer 54-procentigen Lösung von schwefelsaurem Ammonium ausgewaschen. Auf diese Weise wurde eine kleine Menge Substanz gesammelt, welche ich als Präparat 1 bezeichnen werde. Nachher wurde das Filtrat von diesem Niederschlage mit soviel gesättigter Lösung des schwefelsauren Ammoniums versetzt, bis die Flüssigkeit 60 pCt. von diesem Salze enthielt. Der entstandene Niederschlag bildete das Präparat 2. Das Filtrat von diesem Niederschlage ist mit gepulvertem Ammoniumsulfat gesättigt und aus dem entstandenen Niederschlage das Präparat 3 erhalten worden. Es hat sich nach der durchgeführten Prüfung erwiesen, dass im Präparate 3 nur das Pentosan, in 2 ein Gemisch vom Pentosan mit Diastase und in 1 nur Diastase enthalten war. Die Anwesenheit von Diastase in den Präparaten konnte ich mit Hilfe des Millon'schen Reagens und der charakteristischen diastatischen Wirkung erkennen. Ein Tropfen von der Lösung des Präparates 1 wurde zu einer Lösung von 0.1 g löslicher Stärke zugesetzt, diese Flüssigkeit gab nach dem Verlauf von 2—3 Minuten keine Jodreaction mehr, sie reducirte dafür Fehling'sche Lösung sehr stark. Eine so starke diastatische Wirkung habe ich bisher zum ersten Male beobachtet.

Wegen Mangels an Material konnte ich nur wenige Eigenschaften von dieser in hohem Grade gereinigten und unveränderten Diastase untersuchen. Diastase löst sich ziemlich leicht im Wasser, sie gerinnt bei dem Aufkochen ihrer Lösungen weder direct, noch nach dem vorherigen Ansäuern mit Essigsäure oder Salzsäure; erst nach dem Zusatze grösserer Mengen Salzsäure gerinnt sie beim Aufkochen in Form von leichten feinen Flöckchen. Sie giebt bei der Salpetersäureprobe eine leichte, im Ueberschusse des Reagens lösliche Trübung. Die Millon'sche Reaction giebt sie leicht und sehr deutlich, die Xanthoproteinreaction ebenfalls leicht, die Biuretreaction mit der Rosafarbe und einem amethystvioletten Ton; mit Quecksilberchlorid giebt sie keinen Niederschlag, nur eine leichte Trübung, die nach dem Zusatze von Natriumchlorid verschwindet. Diastase giebt

mit Gerbsäure eine voluminöse Fällung, die in einer sogar sehr verdünnten Natronlauge löslich ist. Eine solche schwach alkalische Lösung, bei 50° an der Luft digerirt, wird nur sehr schwach dunkler. Ich habe den folgenden Versuch angestellt, um zu erfahren, ob Diastase in diesem Zustande, trotz der Anwesenheit des Gerbstoffs, ihre charakteristischen Eigenschaften behalten hat.

Eine Lösung von 0.1 g löslicher Stärke wurde mit ein paar Tropfen einer Gerbsäurelösung versetzt; den Niederschlag, welcher dabei entstand, habe ich in einer sehr verdünnten Natronlauge gelöst. Die so erhaltene Lösung habe ich mit einer auf ähnliche Weise dargestellten Diastaselösung vermischt und bei der Temperatur von 50° digerirt. Nach dem Verlauf von einer Stunde schon gab diese Lösung eine Reduction mit dem Fehling'schen Reagens, nach vier Stunden reducirte sie stark.

Dieser mehrmals wiederholte Versuch beweist uns, dass Diastase auch in Anwesenheit der Gerbstoffe ihre Wirkung ausüben kann, wenn nur die Reaction schwach alkalisch ist.

Man könnte vermuthen, dass ähnliche Verhältnisse auch in den Pflanzen vorkommen können, wo ohne Zweifel Diastase oft neben den Gerbstoffen sich befindet.

Nach dieser Abschweifung kehren wir zu den Eigenschaften der Diastase zurück. Diese Eigenschaften bestätigen die früher von mir ausgesprochene Ansicht<sup>1)</sup>, dass Diastase ein Proteinstoff ist, welcher von den bekannten Proteinkörpern den Proteosen am nächsten zu stehen scheint.

In wie weit das Präparat 1 rein war, ist daraus ersichtlich, dass es keine Kohlenhydrate enthielt: die angestellten Reactionen haben darin keinen fremden Proteinkörper entdeckt; aus der ganzen Darstellungsweise ersehen wir, dass die Verunreinigung mit irgend einem anderen, bekannten, organischen Körper unmöglich ist. Die einzige wahrnehmbare Verunreinigung ist das schwefelsaure Ammonium. Es ist ausserdem bis jetzt nicht ermittelt worden, ob die gelbliche Färbung von Präparat 1 der Diastase eigen ist.

Um allen Zweifel daran, dass Diastase ein Proteinstoff ist, zu zerstreuen und um eine Vorststellung über die Reinheit des erhaltenen Präparates zu gewinnen, war es nöthig, eine Elementaranalyse dieses Körpers auszuführen. Zu diesem Zwecke wurde eine kleine Menge Material auf folgende Weise gewonnen. 10 g von einem aus dem Malze erhaltenen Präparate, welches ein Gemisch vom Pentosan und der Diastase bildete, wurde mit Wasser zerrieben, filtrirt und zum klaren Filtrat 2 Vol. von einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung zugesetzt. Nach dem sorgfältigen Auswaschen des gebildeten Niederschlages mit

<sup>1)</sup> Diese Berichte 30, 2289.

demselben Reagens habe ich ihn in einer kleinen Quantität Wasser gelöst und im Laufe von vier Tagen dialysirt. Nachdem die dialysirte Flüssigkeit keine Trübung mehr mit Chlorbaryum gab, wurde sie mit Alkohol und Aether versetzt, der erhaltene Niederschlag mit Alkohol und Aether ausgewaschen und bei 100° getrocknet. Eine Quantität von 0.2375 g erlaubte nur eine Stickstoffbestimmung auszuführen. Die erhaltene Zahl — 16.53 pCt. N — spricht ebenfalls dafür, dass hier ein nicht merkbar verunreinigter Proteinkörper vorliegt.

Zum Zwecke der weiteren Untersuchung der Diastase beabsichtige ich, in der nächsten Zukunft grössere Mengen vom Präparate 1 zu sammeln.

Takadiastase. In ähnlicher Weise wie für die Diastase wurde der Beweis der Proteinnatur auch für ein vom Pilze *Aspergillus oryzae* erzeugtes Ferment, die Takadiastase, durchgeführt<sup>1)</sup>.

Das bei der Untersuchung angewandte Präparat stellt ein ganz rohes Material dar, ein grosser Theil davon ist in Wasser unlöslich; es enthält 44 pCt. Asche, in welcher die Phosphorsalze überwiegen, es wirkt amylytisch, bildet ein Gemisch von verschiedenen chemischen Körpern, unter welchen sich Kohlenhydrate und Proteinstoffe befinden.

300 g von diesem Präparate wurden mit 1 L Wasser zerrieben, aus dem Filtrate wurde mit Alkohol ein bräunlicher, klebriger Niederschlag erzeugt, welcher nach dem Erwärmen mit Salzsäure die Fehling'sche Lösung reducirte. In der Lösung von diesem Niederschlage vermochte ich mit dem Brücke'schen Reagens Kohlenhydrate von den Proteinstoffen zu trennen. Eine kleine Menge des Kohlenhydrates, welches aus dem Filtrate von dem mit Jodkaliumquecksilberjodid erzeugten Niederschlage erhalten wurde, gab sehr leicht nach dem Erwärmen mit Salzsäure und Phloroglucin eine kirschrothe Färbung, was für die Anwesenheit von Pentosen in dem untersuchten Complex spricht. Was die andern Eigenschaften dieses Kohlenhydrates anbetrifft, so habe ich bis jetzt nur das bemerkt, dass es mit Bleiessig einen dicken Niederschlag giebt.

Nach dem Lösen des erwähnten bräunlichen Niederschlages in Wasser, Aussalzen mit Ammoniumsulfat und solange fortgesetztem Dialysiren, bis

<sup>1)</sup> Ein Pfund von Takadiastase, welche in der Medizin Anwendung findet, wurde mir von der Firma Parke, Davis & Co. in Detroit zugeschiedt mit der Bitte, eine chemische Untersuchung dieses Fermentes durchzuführen. Nach einer Privatmittheilung vom Entdecker dieses Fermentes und Leiter seiner Production, Hrn. Jokichi Takamine, wurde das zugesandte Präparat aus der Kultur vom genannten Pilze auf Weizenkleie erhalten.

die dialysirende Flüssigkeit keine Trübung mehr mit Chlorbaryum gab, habe ich eine sehr schwache Lösung von Takadiastase erhalten. Nach dem Fällern und Auswaschen mit Alkohol und Aether wurde ein gelbes Präparat dargestellt, welches amylytisch wirkte, Eiweissreactionen gab und nur sehr kleine Mengen von Kohlenhydrat enthielt; hiervon konnte ich mich durch die Fällung der Takadiastase mit dem Brücke'schen Reagens und Zusatz von Alkohol und Aether zum Filtrate überzeugen, wobei nur ein spärlicher Niederschlag entstand, der diastatisch unwirksam war. Das ganze Verhalten der Takadiastase spricht dafür, dass wir es mit einem Proteinkörper zu thun haben. Es bleibt zu ermitteln, ob dieses Ferment, welches durch *Aspergillus oryzae* erzeugt wird, identisch mit der Malzdiastase ist. Die Lösung dieser Frage und die nähere Untersuchung des erwähnten Kohlenhydrates bildet meine nächste Aufgabe<sup>1)</sup>.

**Invertin.** Für das Invertin hat Barth einen Stickstoffgehalt von 6 pCt., Donath von 9.30 pCt., Adolf Mayer von 4.30 pCt. angegeben<sup>2)</sup>, was entschieden dagegen sprechen sollte, dass Invertin ein Proteinstoff sein könnte. Ich habe zur Lösung dieser Frage zuerst ein Invertinpräparat von Merck, welches aus Presshefe dargestellt war, zur Untersuchung angewendet und konnte mich nach dem Fällern der Proteinstoffe mit dem Brücke'schen Reagens überzeugen, dass dieses Präparat beträchtliche Mengen von einem Kohlenhydrat enthält, welches Fehling'sche Lösung nur nach dem Aufkochen mit Salzsäure reducirt, mit Bleiacetat gefällt, mit Ammoniumsulfat ausgesalzen wird, keine Jodreaction giebt, mit Salzsäure und Phloroglucin nur eine Braunfärbung erzeugt und die Polarisationssebene stark nach rechts dreht; nach der Inversion bleibt aber nur eine ganz geringe Rechtsdrehung. Dieses Kohlenhydrat wirkt nicht invertirend, es dialysirt schwer, aber leichter als die Proteinstoffe. Wir haben hier mit einem Kohlenhydrat zu thun, welches, wenigstens nach den bisherigen spärlichen Beobachtungen, mit irgend einem von den bekannten Kohlenhydraten nicht identisch zu sein scheint.

Zur Darstellung von möglichst reinem Invertin wurden 60 g vom Präparate Merck mit 600 ccm Wasser zerrieben; im Filtrate wurde ein Niederschlag mit Alkohol erzeugt, dieser Niederschlag in Wasser gelöst und die Lösung mit schwefelsaurem Ammonium gesättigt. Den entstandenen Niederschlag habe ich in einer kleinen Quantität Wasser gelöst und solange dialysirt, bis die dialysirte Flüssigkeit keine Trübung mehr mit Baryumchlorid gab. Dann wurde das Invertin unter Zusatz gleicher Volumina Alkohol und Aether nieder-

<sup>1)</sup> Bei der Untersuchung der Takadiastase war mir Hr. Thadeus Paják behilflich.

<sup>2)</sup> E. Bourquelot, Les ferments solubles, 1896, Paris.

geschlagen. Das erhaltene Präparat enthält kein Kohlenhydrat, augenscheinlich wurde es durch das lang andauernde Dialysiren entfernt. Das auf diese Weise erhaltene Invertin giebt die Millon'sche Reaction, Biuretreaction, invertirt Rohrzucker sehr stark, sodass ein Tropfen seiner Lösung im Laufe von 3 Minuten bei  $38^{\circ}$  ca. 3 g Rohrzucker in der Lösung spaltet.

Eine kleine Invertinmenge habe ich auch unmittelbar aus der Hefe erhalten.

$\frac{1}{4}$  ff. Presshefe wurde im Laufe von einigen Stunden mit der doppelten Menge von vollständig reinem Seesand und einer kleinen Quantität von 20-procentigem Alkohol zerrieben und im Laufe von 24 Stunden mit 20-procentigem Alkohol extrahirt. Zum Filtrate habe ich ein Volum Alkohol und ein Volum Aether zugesetzt, wobei ein spärlicher, leichter, schneeweisser Niederschlag entstand, welcher sehr stark invertirend wirkte und einen Proteinstoff darstellte, der mit kleinen Mengen Kohlenhydrat verunreinigt war. Nach der Behandlung dieses Niederschlages auf eine ähnliche Weise, wie es früher mit dem Merck'schen Präparate geschah, habe ich nach dem Dialysiren, Filtriren durch eine Chamberland-Kerze und Niederschlagen mit Alkohol und Aether eine sehr kleine Quantität von einem stark wirksamen Proteinstoffe erhalten.

Das Vorhandensein eines Kohlenhydrates in den wenig gereinigten Invertinpräparaten erklärt uns, warum Barth, Donath, Mayer u. A. bei den Elementaranalysen ihrer Präparate so niedrige Zahlen für den Stickstoff gefunden haben, und warum sie das Invertin als verschieden von den Proteinkörpern angesehen haben.

Hüfner und andere Forscher waren der Meinung, dass Fermente und unter ihnen Invertin aus den Eiweissstoffen durch Oxydationsprocesse entstehen, und dass sie als Oxydationsproducte viel mehr Sauerstoff und weniger Stickstoff, als ihre Muttersubstanzen enthalten müssen. Man führte als Beweis dafür die wichtige Rolle an, welche die Anwesenheit des Sauerstoffs bei der Entstehung der Fermente spielen sollte. Der Sauerstoff sollte auch für die enzymatischen Processe nothwendig sein. Die Thatsachen, welche ich in dieser Mittheilung vorlege, sprechen ausdrücklich dafür, dass die amylolytischen Fermente keine Oxydationsproducte der Eiweissstoffe bilden. Dass zur enzymatischen Wirkung kein Sauerstoff nothwendig ist, ersehen wir aus den Untersuchungen von Godlewski und Polzeniusz<sup>1)</sup> über Alkoholbildung bei der intramolekularen Athmung höherer Pflanzen, welche bewiesen haben, dass die Diastase und das Invertin ohne Luftzutritt in den Erbsensamen entstehen und ihre Wirkung ausüben können.

<sup>1)</sup> Anzeiger d. Acad. d. Wissensch. in Krakau, Juli 1897.

Das erwähnte Kohlenhydrat stellt an und für sich einen interessanten Körper dar. Was für eine Rolle ihm in dem Leben der Hefe zuertheilt ist, ob es ein Stoffwechselproduct derselben ist, das sind die sich aufdrängenden Fragen.

In Bezug auf die Thatsache, dass Diastase, Takadiastase und Invertin in Begleitung von Kohlenhydraten angetroffen werden, welche gewisse, ähnliche, physikalische Eigenschaften wie diese Körper besitzen, könnte die Frage auftauchen, ob diese Kohlenhydrate, wenn sie auch unwirksam sind, doch bei der Wirkung der erwähnten Fermente irgend eine für uns unbekanntere Rolle spielen. Ausser den in dieser Mittheilung erwähnten, spricht dagegen auch die Thatsache, dass ein verwandtes Ferment, das Ptyalin, von keinem Kohlenhydrate begleitet wird, wie ich es für die Merck'schen, aus dem Hundepepsin dargestellten Präparate constatiren konnte. Dasselbe Resultat ergab die eingehende Prüfung einer kleinen Ptyalinmenge, die aus 100 ccm menschlichen Mischspeichels dargestellt wurde.

K. K. allg. Unters.-Anst. f. Lebensmittel in Krakau.

## 192. Ferd. Keppler: Zur Kenntniss des Phenyljodidchlorids.

(Eingegangen am 6. April.)

Das von Willgerodt entdeckte Phenyljodidchlorid ist bekanntlich eine sehr wenig beständige Substanz. Unter Anderem berichtet Willgerodt<sup>1)</sup> über diese Substanz auch, dass sie sich beim Aufbewahren in einem mit Glasstopfen versehenen Gefässe für immer zu halten scheine.

Ueberraschend war daher die Beobachtung, dass ein in festverschlossenem Glasgefässe und im Dunkeln aufbewahrtes Präparat von Phenyljodidchlorid nach ca. sechswöchentlicher Aufbewahrung sich nur noch als braungefärbte Flüssigkeit vorwies, und beim Oeffnen des Gefässes Salzsäuregas unter starkem Druck entwich. Offenbar hatte hier in dieser Zeit das in dem Phenyljodidchlorid nur locker gebundene Chlor substituierend eingewirkt.

Diese Beobachtung veranlasste nun folgende Versuche:

30 g aus ganz reinem und farblosem Jodbenzol (von der Firma Kahlbaum bezogen) in bekannter Weise erhaltenes Phenyljodidchlorid wurden in 3 Glasröhren eingeschlossen und Rohr 1 ganz im Dunkeln aufbewahrt, Rohr 2 dem zerstreuten Tageslichte und Rohr 3 möglichst dem directen Sonnenlichte ausgesetzt. Die Beobachtung

<sup>1)</sup> Journ. für prakt. Chem. 33, 154. Diese Berichte 25, 3494.